

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. H. Hensel

**Untersuchungen zur Differenzierung von
P- und T-Aktivierungssystemen an der Magenmuskulatur
von Meerschweinchen**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg**

vorgelegt von
Bernd Wagner
aus Berlinchen, Krs. Soldin

Marburg 1976

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. H. Hensel

**Untersuchungen zur Differenzierung von
P- und T-Aktivierungssystemen an der Magenmuskulatur
von Meerschweinchen**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Bernd Wagner
aus Berlinchen, Krs. Soldin

Marburg 1976



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 28. 5. 1976
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. med. K. Golenhofen
Correferent: Prof. Dr. med. J. Portig

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methodisches	7
2.1. Nährlösungen	7
2.1.1. Präparierlösung	7
2.1.2. Modifizierte Krebslösung	7
2.2. Testsubstanzen	7
2.3. Organbadversuche	7
2.3.1. Isolierte Streifenpräparate	8
2.3.2. Isolierter ganzer Magen	9
2.4. Intrazelluläre Messungen des Membran- potentials	11
2.5. Extrazelluläre Messungen des Membran- potentials	16
2.5.1. Die durchströmte Kapillare	17
2.5.2. Das Saccharose-Trennwandverfahren	18
2.6. Statistische Verfahren	20
3. Versuchsergebnisse	23
3.1. Organbadversuche	23
3.1.1. Streifenpräparate	23
3.1.1.1. Die mechanische Aktivität der Magen- muskulatur	23
3.1.1.2. Vorversuche zur Dosierung der Pharmaka und die Wirkung von TTX	23
3.1.1.3. Der Einfluß von Na-Nitroprussid und D600 auf die mechanische Spontanaktivität	24
3.1.1.4. Untersuchungen zur 2-Phasen-Aktivierung durch Acetylcholin	25
3.1.1.5. Die Wirkungen von Na-Nitroprussid und D600 auf die Acetylcholin-induzierte Aktivität	27
3.1.1.6. Die Wirkungen von Nifedipin und Diazoxid auf die mechanische Aktivität	30
3.1.1.7. Methodisches zur Bestimmung der Wirkung von Na-Nitroprussid	34

	Seite
3.1.2. Ganzer Magen	35
3.2. Elektrophysiologische Untersuchungen	37
3.2.1. Spontane elektrische Aktivitätsmuster der Magenmuskulatur des Meerschweinchens	37
3.2.2. Der Einfluß von Na-Nitroprussid und D600 auf die elektrische Spontanaktivität	41
3.2.3. Das Membranpotential bei Calcium-Entzug	45
3.2.4. Der Einfluß von Acetylcholin auf die elektrische Aktivität	47
3.2.5. Die Wirkung von Na-Nitroprussid und D600 auf die Acetylcholin-induzierte elektrische Aktivität	48
3.2.6. Bestimmung des maximalen basalen Membran- potentials zirkulärer Antrumstreifen	55
4. Diskussion	60
4.1. Die Wirkungen von Na-Nitroprussid und D600 auf die Aktivität der Magenmuskulatur des Meerschweinchens	60
4.2. Messungen des maximalen basalen Membran- potentials	68
5. Zusammenfassung	71
Anhang: Untersuchungen von Glasmikroelektroden mit unterschiedlichen Spitzenpotentialen	73
Literaturverzeichnis	77

1. Einleitung

Prosser betonte 1974a, daß es keine zwei identischen glatten Muskeln gäbe und daß vergleichbare Muskeln verschiedener Spezies wiederum unterschiedliche Eigenschaften haben könnten. Er wies darauf hin, daß gegenwärtig beachtliche Unterschiede in den Befunden über die elektrischen und mechanischen Aktivitäten sowie über die Wirkung neuraler und hormonaler Regulationen der glatten Muskulatur existieren.

Der glatte Muskel, der unter physiologischen Bedingungen sowohl adrenerg als auch cholinerg erregt werden kann, zeigt in vielen Fällen spontane Aktivität, die weitgehend unabhängig von neuronalen oder hormonalen Einflüssen ablaufen kann. Diese myogene Aktivität kann in phasisch-rhythmischen Kontraktionen oder in einem Dauertonus sowie in Mischformen ihren Ausdruck finden.

Die funktionelle Vielfalt des glatten Muskels drückt sich auch bei Messungen des Membranpotentials aus. Neben Muskelzellen, die ein relativ konstantes Membranpotential aufweisen, gibt es andere, deren Membranpotential rhythmischen Fluktuationen unterschiedlicher Amplitude und Frequenz unterworfen ist. In einer Reihe von Muskeln des Gastrointestinaltraktes und des Gefäßsystems treten schnelle Änderungen des Membranpotentials auf, die in einer Zeit der Größenordnung von 10 ms ablaufen können und als "Aktionspotentiale" oder "Spikes" bezeichnet werden. Die Spikes können anderen Membranereignissen überlagert sein (Burnstock et al. 1963, Holman 1968, Tomita 1970, Bohr 1973, Prosser 1974a, Golenhofen 1970 und 1976a).

Durch Messungen des Membranpotentials bei gleichzeitiger Registrierung der Kraftentwicklung versucht man, Aufschluß über die Mechanismen der Erregungs-Kontraktions-Kopplung des glatten Muskels zu erhalten. Solche Messungen, die insbesondere durch die Verfeinerung der Mikroelektrodenteknik ermöglicht wurden (Ling und Gerard 1949), geben Hinweise auf eine elektromechanische Kopplung am glatten Muskel.

Am Skelettmuskel wird unter physiologischen Bedingungen der Kontraktionsprozeß entweder durch Aktionspotentiale oder durch eine graduelle Depolarisation der Zellmembran eingeleitet, wodurch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration bewirkt wird (Huxley 1974).

Auch am glatten Muskel nimmt Calcium eine zentrale Rolle im Kontraktionsprozeß ein (Ebashi und Endo 1968): Die Bereitstellung von Ca^{++} -Ionen an den kontraktilen Proteinen bringt diese in den aktiven Zustand ("Aktivatorcalcium") und bewirkt die Umsetzung von in ATP chemisch gespeicherter Energie in mechanische Arbeit. Der Mechanismus, der die Erhöhung der intrazellulären Konzentration an freiem Calcium bewirkt, ist noch Gegenstand vielfältiger Untersuchungen.

Im Zusammenhang mit der Ca^{++} -Aktivierung wird häufig die Rolle der Spike-Entladungen diskutiert, die an den meist spontanaktiven glatten Muskeln des Gastrointestinaltraktes und verschiedenen Gefäßmuskeln gemessen werden.

Der Spike wurde zunächst als das normale Membranereignis aufgefaßt, das die Kontraktion des glatten Muskels auslöst (Übersichten: Burnstock et al. 1963, Bohr 1964). Dieses Konzept wurde jedoch aufgrund späterer elektrophysiologischer Untersuchungen insbesondere an Gefäßmuskeln stark in Zweifel gezogen, da hier Kontraktionen ohne Spike-Entladungen ausgelöst werden konnten (Übersichten: Bohr 1973, Somlyo und Somlyo 1968, Johanson 1971). Befunde an Muskeln des Gastrointestinaltraktes, die häufig langsame, sinusoidale Schwankungen des basalen Membranpotentials zeigen, führten zu der Theorie, daß diese "slow waves" die peristaltischen Kontraktionen steuerten (Daniel und Irwin 1968). Papasova 1970 differenzierte die Kontraktionen des glatten Muskels in schwächere, die durch langsame elektrische Wellen ausgelöst würden und stärkere, die durch Frequenz und Amplitude von Spike-Entladungen gesteuert würden. Dagegen nimmt im Konzept von Sarna et al. 1972 und Sarna und Daniel 1973 der Spike am Intestinaltrakt als "electrical response activity" wieder

die Rolle der Kontraktionsauslösung ein, während dort die langsamen Potentialwellen als "electrical control activity" bezeichnet werden.

Bei Untersuchungen über die Rolle der Spike-Entladungen am glatten Muskel testete Golenhofen Verapamil und sein Methoxyderivat D600, beides Substanzen, die am Warmblütermyokard durch einen Calcium-antagonistischen Effekt die elektromechanische Kopplung unterbrechen (Fleckenstein et al. 1967, 1968, 1969), d.h. die Kontraktion unterdrücken, ohne das Aktionspotential am Herzen wesentlich zu verändern. Beide Substanzen blockierten an verschiedenen glatten Muskeln Spike-Entladungen (Golenhofen und Lammel 1972, Golenhofen et al. 1973, Riemer et al. 1974a), worauf Untersuchungen von Fleckenstein et al. 1971 an Uterusmuskulatur bereits hingewiesen hatten.

Die völlige Blockade der Spike-Entladungen durch Verapamil oder D600 unterbindet jedoch nicht in allen Fällen gleichzeitig die gesamte spontane oder durch Wirkstoffe induzierte mechanische Aktivität (Golenhofen und Lammel 1972, Golenhofen und Wegner 1972 und 1975, Golenhofen und Hermstein 1973 und 1975, Golenhofen et al. 1973, Bilek et al. 1974).

Die durch Verapamil und D600 nicht hemmbare Komponente der mechanischen Aktivität ist sowohl an Muskeln des Gastrointestinaltraktes als auch an Gefäßmuskeln bei verschiedenen Spezies tonischer Natur. Boev et al. berichteten 1973 und 1976 von einer selektiven Blockierbarkeit dieser D600-resistenten tonischen Aktivierungskomponente bei Magenpräparaten von Katzen und Meerschweinchen durch Natrium-Nitroprussid (NP), dessen antihypertensive Wirkung seit langem bekannt ist (Davidssohn 1887, Johnson 1929, Kynčl 1971, Page et al. 1955, Thienes 1926, Kreye 1974, Kreye et al. 1975).

In Abb. 1 ist ein typisches Experiment an zirkulären Muskelstreifen aus verschiedenen Regionen des Katzenmagens dargestellt. Im Kontrollversuch wurde durch NP die tonische Acetylcholin (ACh)-induzierte Aktivierung gehemmt, während die phasischen

Kontraktionskomponenten weitgehend unbeeinflusst blieben. Unter D600 führte ACh zu einer ausschließlich tonischen Aktivierung, die wiederum durch NP gehemmt werden konnte.

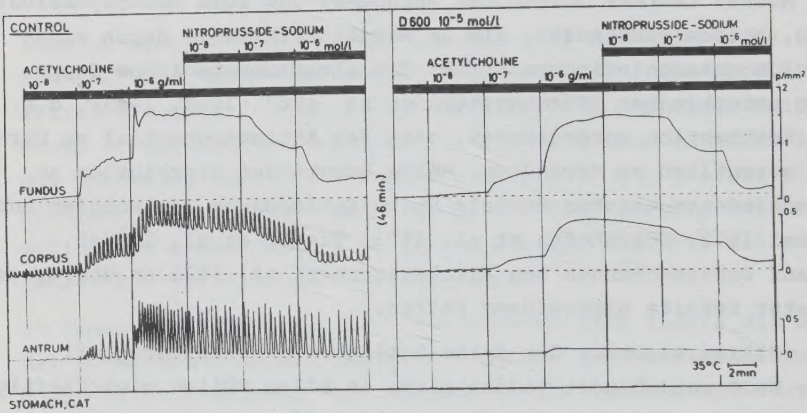


Abb. 1: Mechanogramme von Muskelpräparaten verschiedener Regionen des Katzenmagens (Boev et al. 1976). In beiden Versuchen wurde Acetylcholin und Na-Nitroprussid in steigenden Konzentrationen appliziert. Im rechten Teil der Abbildung wurde der Versuch unter der Wirkung von D600 durchgeführt, wodurch phasische Kontraktionen bei nahezu unveränderter tonischer Reaktion selektiv unterdrückt wurden.

Diese Befunde legten aufgrund der selektiven Blockierbarkeit phasischer und tonischer Aktivierungskomponenten die Existenz zweier Calcium-Aktivierungssysteme nahe (Golenhofen 1973, 1975, 1976b, Golenhofen und Neuser 1974). Da die durch D600 blockierbare Aktivierungskomponente meist durch phasische Kontraktionen gekennzeichnet ist, wurde dieses Aktivierungssystem "P-System" genannt. Für die überwiegend tonische D600-resistente Aktivierungskomponente, die in der Mehrzahl der Fälle mit NP selektiv

gehemmt werden kann, wurde die Bezeichnung "T-System" eingeführt. Die bisher vorliegenden Befunde können durch die Annahme erklärt werden, daß die beiden Aktivierungssysteme parallel im Mechanismus der Bereitstellung von Ca^{++} in der Zelle arbeiten. Da die verschiedenen Aktivierungskomponenten auch noch nach Blockade der cholinergen und adrenergen Rezeptoren an der Außenseite der Zellmembran durch Atropin getrennt beobachtbar sind, müssen auch myogene Kontrollmechanismen auf die P- und T-Systeme wirken.

Es gibt darüber hinaus Hinweise darauf, daß in jeder glatten Muskelzelle beide Aktivierungsmechanismen angelegt sind. Über jeden der beiden Aktivierungsmechanismen kann bei Blockade des anderen eine maximale Kontraktion des Muskels ausgelöst werden (Mandrek und Golenhofen 1975 und 1976).

In Abb. 2 ist ein Schema der Calciumaktivierung der glatten Muskelzelle angegeben, das diese Vorstellungen beinhaltet.

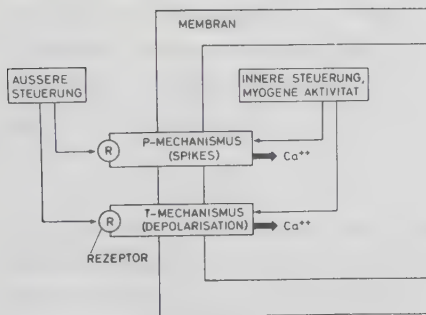


Abb. 2: Schematische Darstellung des Konzepts zweier pharmakologisch differenzierbarer Aktivierungssysteme von glatten Muskelzellen (Golenhofen 1976b)

Das vorgestellte P-T-Konzept unterscheidet also zwischen pharmakologisch differenzierbaren Ca^{++} -Aktivierungssystemen, die vermutlich in oder an der Zellmembran lokalisiert sind. Mögliche morphologische Differenzierungen zwischen Spike-generierenden Zellen und solchen mit gradueller tonischer Reiz-

antwort, von denen Devine et al. 1973 und Somlyo 1975 berichteten, sind davon grundsätzlich unberührt.

Über die Wirkung der P-Antagonisten Verapamil und D600 auf die elektrische und mechanische Aktivität glatter Muskelzellen liegen bereits eine Reihe umfangreicher Veröffentlichungen vor, auf die bereits hingewiesen wurde. Dagegen liegen elektrophysiologische Untersuchungen glatter Muskulatur unter der Wirkung von NP bisher nicht vor. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe von Organbadversuchen und verschiedenen elektrophysiologischen Methoden die P- und T-Aktivierungssysteme der glatten Muskulatur des Meerschweinchenmagens näher zu untersuchen.

Die Versuchsprogramme wurden sowohl an vorwiegend phasisch aktiven isolierten Muskelstreifen der Antrumregion als auch an überwiegend tonisch aktiven Fundusstreifen durchgeführt. Über einen Teil der Ergebnisse liegen bereits Kurzberichte vor (Wagner und Golenhofen 1975 und 1976).

2. Methodisches

2.1. Nährlösungen

2.1.1. Präparierlösung

Während der Präparation der für die Versuche benötigten Muskelstreifen wurden die entsprechenden Muskelregionen ständig mit Präparierlösung feucht gehalten. Diese war wie folgt zusammengesetzt (Substanz/Konzentration mmol/l):

Na^+ /144; K^+ /5,9; Ca^{++} /3,7; Cl^- /157.

2.1.2. Modifizierte Krebslösung

Zur Ernährung der Muskelpräparate während der Versuche wurde eine modifizierte Krebslösung verwendet (Krebs-Henseleit 1932), wobei Magnesiumchlorid durch Magnesiumsulfat ersetzt wurde. Die Lösung wurde jeweils vor Versuchsbeginn aus isotonischen Stammlösungen hergestellt; die gegen Bakterienbefall besonders anfällige Glukoselösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt. Die Nährlösung wurde ständig mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) auf einen Wert von etwa pH 7,3 äquilibriert. Die Zusammensetzung der Lösung ist aus folgender Aufstellung ersichtlich (Substanz/Konzentration mmol/l):

Na^+ /137; K^+ /5,9; Mg^{++} /1,2; Ca^{++} /2,5; Cl^- /118,5; H_2PO_4^- /1,2; HCO_3^- /25; Glukose 11,5.

2.2. Testsubstanzen

Acetylcholin (ACh): Lematte et Boinot, Paris

Tetrodotoxin (TTX): Sankyo Co., Ltd., Tokio

Natrium-Nitroprussid (NP): Merck, Darmstadt

D600-Hydrochlorid: Knoll, Ludwigshafen

Diazoxid: (Handelsname: Hypertonalum^R), Byk-Essex, München

Nifedipin: (Name der Testsubstanz: Bay a 1040; Handelsname:

Adalat^R), Bayer, Leverkusen

2.3. Organbadversuche

66 männliche Meerschweinchen mit einem Gewicht zwischen 350 g und 550 g wurden durch Nackenschlag und Ausbluten getötet. Nach

dem Öffnen der Bauchdecke wurde der Magen freigelegt und möglichst rasch die Präparation durchgeführt.

2.3.1. Isolierte Streifenpräparate

Aus 15 Meerschweinchen wurden je zwei bis sechs zirkuläre Streifen der Magenmuskulatur mit in-situ-Abmessungen von ca. 2-3 mm Breite und einer Länge von 20-30 mm entnommen. Bei sorgfältiger Präparation stellte sich bei diesen Abmessungen stets eine synchronisierte Spontanaktivität der Muskelstreifen im Organbad ein. Die Präparate wurden entsprechend der Skizze in Abb. 3 aus funktionell unterschiedlichen Regionen des Magens gewählt.

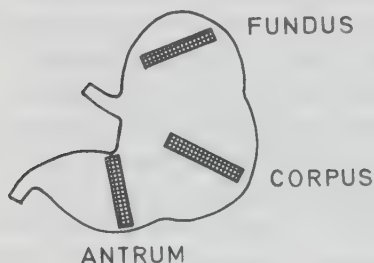


Abb. 3: Skizze eines Meerschweinchenmagens. Die schraffierten Flächen geben die ungefähre Lage der präparierten Muskelstreifen an.

Nach Festlegung der in-situ-Länge der Präparate durch zwei kurze Einschnitte wurden zwei parallel laufende Schnitte zirkulär in den außen liegenden Muskelschichten des Magens geführt. Dann wurde die Muskulatur mit einer Pinzettenschere oder, wenn möglich, stumpf von der Tunica mucosa getrennt. Der so gewonnene Muskelstreifen wurde an beiden Enden mit je einem Faden umschlungen und bis zur Überführung in die Versuchsanordnung in einem Gefäß mit Präparierlösung aufbewahrt. Vor dem Einbringen in das Organbad wurde einer der Fäden an einem Präparatehalter aus Glas befestigt, während nach der Überführung in das Organbad der zweite Faden den Muskelstreifen in vertikaler Anordnung mit einem mechanoelektrischen Transducer (Swema SG4-90, Stockholm) zur Messung der mechanischen Muskelaktivität verband.

Der Meßplatz verfügte über zwei Organbäder, in die jeweils bis zu vier Präparatestreifen eingebracht werden konnten. Die mechanoelektrischen Transducer wurden mit einer 5 V - Gleichspannungsquelle (Eigenbau) oder mittels Meßbrücken mit Trägerfrequenz (Hellige TF 19, Freiburg) versorgt und ihre Ausgangssignale einem 6-Kanal-Direktschreiber (Rikadenki Kogyo KA-61, Tokio) zugeleitet. Die Vordehnung der Muskelstreifen wurde so gewählt, daß sie ihre in-situ-Länge einnahmen. Nach spätestens 60 min hatten die Präparate normalerweise eine stationäre Sontanaktivität entwickelt.

Die Nährlösung in den doppelwandigen Organbädern wurde durch umlaufendes thermostatisiertes Wasser auf einer Temperatur von 35° C gehalten. Auch die Austauschlösung zum Ausspülen applizierter Testlösungen wurde mittels eines Wärmeaustauschers auf diese Temperatur vorgewärmt, so daß lang anhaltende Störungen der Aktivität durch Temperaturänderungen vermieden werden konnten.

2.3.2. Isolierter ganzer Magen

Zur Untersuchung der mechanischen Aktivität des gesamten isolierten Magens bei 4 Meerschweinchen wurde dieser am Oesophagus oberhalb des Ostium cardiacum sowie auf der distalen Seite des Pylorus abgetrennt und in eine Petrischale mit Präparierlösung überführt. In die entstandenen Magenöffnungen wurden Glasröhrchen mit einem Außendurchmesser von 3 mm und einem Innendurchmesser von 1,5 mm eingeschoben und mit Fäden befestigt. Durch abwechselndes vorsichtiges Aussaugen des Magens mit einer Wasserstrahlpumpe und Spülen mit Präparierlösung wurde dieser entleert und gesäubert. In einem Organbad wurde der völlig entleerte Magen so weit mit Nährlösung gefüllt, bis er seine in-situ-Abmessungen einnahm. Dann wurde eine der Glasröhren verschlossen und die zweite möglichst kurz und luftblasenfrei mit einem gegen kleine Druckschwankungen stabilen PVC-Schlauch mit einem Druckaufnehmer (Statham, Hellige, Freiburg) verbunden. Der Druckauf-

nehmer wurde an eine Meßbrücke (Hellige TF 19, Freiburg) angeschlossen, deren Ausgangssignal einem Potentiometerschreiber (Rikadenki Kogyo KA-61, Tokio) zugeleitet wurde. Eine Darstellung der Meßanordnung zeigt Abb. 4.

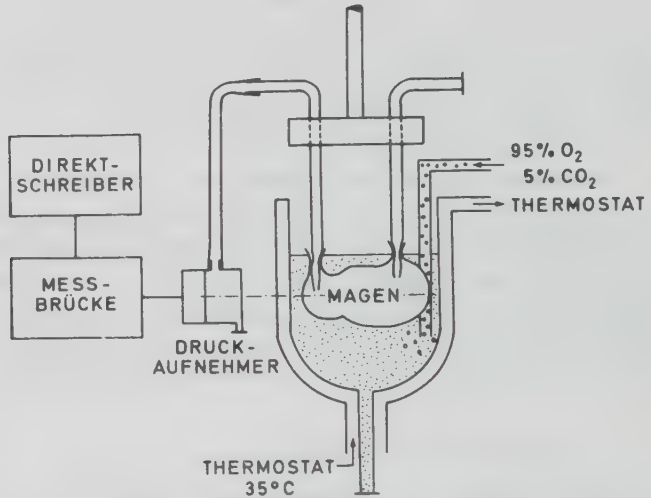


Abb. 4: Schema der Anordnung zur Untersuchung des isolierten ganzen Meerschweinchenmagens

Vor Beginn des Testprogrammes wurde der Magen mehrere Male mit Nährlösung gespült, um den Einfluß von Magensekreten auf einem Minimum zu halten. Ebenso wurde nach jedem Testprogramm eine mehrfache Spülung des Mageninnenraumes vorgenommen.

Der Druckaufnehmer wurde in Höhe der Mitte des etwa horizontal im Organbad angeordneten Magens angebracht. Auf diese Weise konnten systematische Meßfehler aufgrund des hydrostatischen Druckes im Meßsystem weitestgehend vermieden werden. Nullpunktverschiebend wirkte daher lediglich der hydrostatische Druck der Nährlösung im Organbad oberhalb des Magens, der möglichst

gering gehalten wurde. Die Größe der Verschiebung wurde bei völlig erschlafftem Magen im von Nährlösung entleerten Organbad bestimmt. Der in den Meßkurven eingetragene Druck-Nullpunkt wurde derart ermittelt.

2.4. Intrazelluläre Messungen des Membranpotentials

Die angewandte Präparationstechnik zur intrazellulären Ableitung des Membranpotentials entspricht weitgehend der von Golenhofen und v. Loh 1970. Für die Untersuchungen wurden 36 Meerschweinchen verwendet.

Durch einen longitudinalen Einschnitt an der großen Krümmung des Magens wurde die Muskelschicht aufgetrennt. Mit einer gebogenen Pinzette, die im Greifbereich glattgeschliffen und poliert worden war, wurde dann durch Einschieben und vorsichtiges Spreizen der Pinzette die Muskelschicht stumpf von der Tunica mucosa getrennt. In die so entstandene "Tasche" wurde ein Präparatehalter aus Acrylglas (Abb. 5) so eingeschoben, daß die Muskelschicht über das am Umfang mit einer Nut versehene kreisförmige Scheibchen (4 mm Ø) zu liegen kam. Durch leichtes Anheben des Präparatehalters wurde die Muskelschicht über den Rand des Scheibchens gespannt. Nun wurde mit einer feinen Nadel ein Faden so über der Muskelschicht in die Umfangsnut des Scheibchens eingezogen, daß ein etwa 2-3 mm breites Stück des Muskels nicht durch den Faden in die Umfangsnut eingeklemmt wurde. Ausgehend von diesem nicht eingeklemmten Muskelbereich wurde ein Muskelstreifen zirkulär freipräpariert, der eine in-situ-Länge von etwa 20 mm besaß.

Auf diese Weise erhält man einen relativ fixierten Muskelbereich über dem Scheibchen des Halters, der sich zur Penetration mit Glasmikroelektroden für langfristige kontinuierliche Messungen eignet. Vom überstehenden Teil des Präparates kann die mechanische Aktivität der Muskulatur mit Hilfe eines mechanoelektrischen Transducers unter völlig normalen Dehnungsbedingungen abgeleitet werden (Abb. 6).

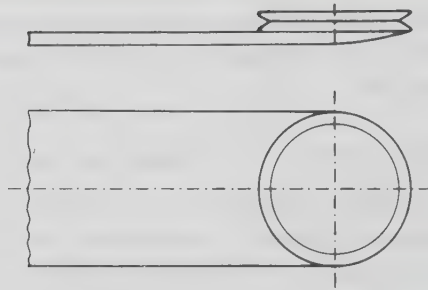


Abb. 5: Skizze des Präparatehalters für die intrazelluläre Potentialableitung

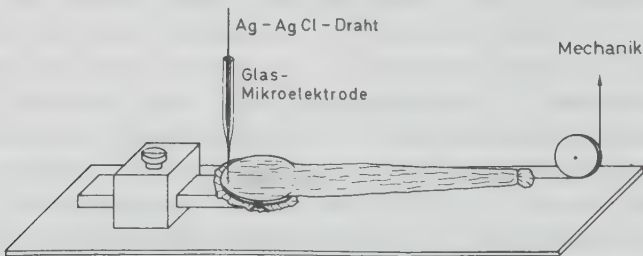


Abb. 6: Präparierter Muskelstreifen für die intrazelluläre Potentialableitung

Der Aufbau der Versuchsanordnung (Abb. 7) ähnelt dem bei v. Loh 1969 und Golenhofen und v. Loh 1970 beschriebenen. Der Präparatehalter wurde in einer temperierten Meßkammer mit etwa 10 ml Inhalt befestigt, in die vom Boden her ständig Nährlösung zufließt und die von der offenen Oberseite aus kontinuierlich durch

eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde. Über einen Zweiwegehahn konnte wahlweise Nährlösung oder Testlösung in die Meßkammer eingeleitet werden. Auf diese Weise konnten Meßstörungen durch Eintropfen von Testsubstanzen direkt in die Meßkammer vermieden und eine definierte Konzentration der Testlösung in der Meßkammer erreicht werden. Die Zulaufgeschwindigkeit wurde durch einen Tropfer auf etwa 1 Tropfen/sec eingestellt, entsprechend einer Austauschgeschwindigkeit von etwa 3 ml/min.

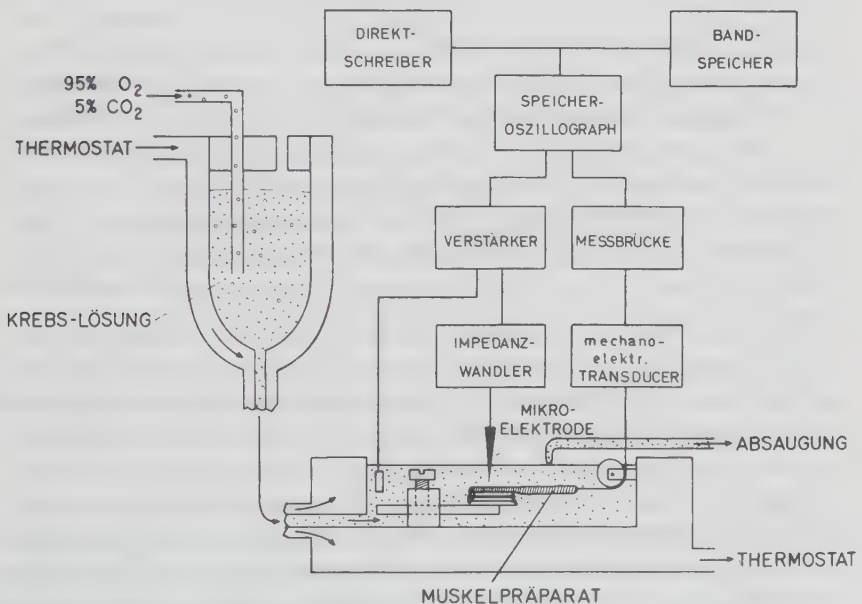


Abb. 7: Schema des Versuchsaufbaus zur intrazellulären Potentialableitung

Vorratsbehälter, Zweiwegehahn, Zuleitungen und Meßkammer waren durch thermostatisiertes Wasser so temperiert, daß sich die Lösung in der Meßkammer auf einer Temperatur von 35° C befand.

Die Vorratsflaschen für die Nähr- bzw. Testlösung wurden mit Carbogen begast. Der pH-Wert der Lösung im Organbad, das nicht begast wurde, war gegenüber dem in den Vorratsbehältern unverändert (pH 7,3).

Zur intrazellulären Ableitung des Membranpotentials wurden Glasmikroelektroden verwendet (Ling und Gerard 1949), die mit einem Ziehgerät vom Livingston-Typ (Frank und Becker 1964) hergestellt wurden. Nach elektronenoptischen Untersuchungen hatten die feinsten Elektroden einen Außendurchmesser von etwa $0,2 \mu\text{m}$ und darunter.

Nach einem Vorschlag von Nastuk und Hodgkin 1950 wurden die Mikropipetten mit einer 3-molaren Lösung von KCl in Wasser gefüllt, wodurch zum einen der elektrische Innenwiderstand der Elektroden möglichst klein gehalten wird und zum anderen wegen der vergleichbaren Ionenbeweglichkeit von K^+ und Cl^- die Ausbildung eines Diffusionspotentials zwischen Elektrodenfüllung und Umgebung ("liquid junction potential") nahezu verhindert wird. Die hier verwendeten Elektroden hatten elektrische Widerstände zwischen 30 M Ohm und 150 M Ohm.

Die Füllung der Glaspipetten erfolgte in abkühlender Elektrolytlösung bei einem durch eine Wasserstrahlpumpe verminderten Druck bis unterhalb von 10 Torr (Tasaki et al. 1954). Dabei waren 24 Mikroelektroden auf einem Halter aus Acrylglas durch einen Ringgummi befestigt und einschließlich des Elektrodenschaftes in die Elektrolytlösung eingetaucht. Um die Gefahr der Zerstörung der Elektrodenspitzen durch in der Flüssigkeit aufsteigende Luftblasen zu verringern, wurde der Unterdruck vorsichtig mit fallender Temperatur der Elektrolytlösung erhöht. Nach dem völligen Abkühlen der Flüssigkeit auf Raumtemperatur waren die Elektroden gebrauchsfertig; sie wurden jedoch im Regelfall am Vorabend eines Experimentes hergestellt. Elektroden, die älter als 3 Tage waren, wurden wegen erhöhter Neigung zum Abbrechen nicht mehr verwendet.

Die zur Füllung der Elektroden verwendete Elektrolytlösung wurde

vor dem Gebrauch mit Hilfe eines Millipor-Filter (0,1 μ m Porenweite) gereinigt. Durch dieses Verfahren wurde eine Verringerung des Spitzenpotentials der Elektroden (Adrian 1956) bewirkt (s.a. Anhang).

Zur Penetration wurden die Mikroelektroden mit dem Schaft auf einen 0,2 mm dicken und etwa 25 mm langen chlorierten Silberdraht gesteckt, auf dem sie durch Reibkräfte auch in senkrechter Lage hafteten. Mittels eines Mikromanipulators (Leitz, Wetzlar) wurde die Elektroden spitze unter Sichtkontrolle durch ein Stereomikroskop (Zeiss, Oberkochen) in unmittelbare Nähe der Präparateoberfläche gebracht und dann mit feinsten Schritten die Muskeleoberfläche angetastet. Das Berühren der Muskelfasern wurde durch kleine Veränderungen des mittels eines Oszillographen registrierten Meßpotentials angezeigt. Die Penetration der Glasmikroelektrode in das Zellinnere bewirkte bei brauchbaren Elektroden und intakter Zelle einen deutlichen Potentialsprung in der Größenordnung des Membranpotentials (Abb. 32).

Die Messung des Membranpotentials erfolgte gegen eine indifferente Agar-Ag/AgCl-Elektrode (chlorierter Silberdraht in Glaskapillare mit erstarrter Lösung von Agar in 3 M KCl), die in der Meßkammer befestigt war. Von der Mikroelektrode wurde das Meßsignal zunächst einem Impedanzwandler und von diesem einem Operationsverstärker mit negativer kapazitiver Rückkopplung (BAK, Electronic for Life Sciences, Rockville, Maryland) zugeführt. Dieser Breitband-Verstärker erlaubte neben der Verstärkung des Eingangssignals die Kompensation von Asymmetriespannungen des Meßkreises und die Messung der Impedanz der Mikroelektroden mit Hilfe einer Rechteckspannungsquelle (Calibration-output vom Oszillographen). Vom Operationsverstärker wurde das Meßsignal einem Zweistrahl-Speicheroszillographen (Tektronix D 13, Beaverton, Oregon) zugeleitet, mit dem die Absolutbestimmung des Meßsignals durchgeführt wurde.

Das verstärkte Ausgangssignal des Oszillographen wurde dann parallel einem Direktschreiber (Schwarzer Varioscrypt, München) und einem Bandspeicher (Ampex SP 300, Redwood City, California)

zugeführt. Die Grenzfrequenz des Direktschreibers lag bei 100 Hz, so daß die auftretenden Änderungen des Membranpotentials im Millisekunden-Bereich (Spikes) nicht mehr originalgetreu aufgezeichnet werden konnten; bei Direktschreibung wurden die Spike-Amplituden um 20 - 30 % zu niedrig wiedergegeben. Dieser Fehler konnte mit Hilfe des Bandspeichers umgangen werden, indem dessen Wiedergabegeschwindigkeit soweit reduziert wurde, bis die Membranereignisse amplitudengetreu vom Schreiber registriert werden konnten. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens war es, daß die Wiedergabe in einem für die Abbildungen geeigneten Maßstab vorgenommen werden und das identische Ereignis mit unterschiedlicher zeitlicher Auflösung dargestellt werden konnte.

2.5. Extrazelluläre Messungen des Membranpotentials

2.5.1. Die durchströmte Kapillare

Die hier verwendete Apparatur zur extrazellulären Messung von elektrischen Membranereignissen ist identisch mit der von v. Loh 1969 und von Golenhofen und v. Loh 1970 ausführlich beschriebenen Anordnung (Abb. 8). Sie besteht aus einer horizontal angebrachten 50 mm langen Glaskapillare mit einem Innendurchmesser von 2 mm, in die fünf Platindrähte (Delgado 1964) eingeschmolzen sind. Diese ragen halbkreisförmig in das Lumen der Kapillare und können sowohl zur bipolaren Ableitung elektrischer Ereignisse als auch zur Applikation elektrischer Reize dienen. Bringt man in die Kapillare ein geeignetes Muskelpräparat ein, so kommt die Muskeloberfläche auf die Platinelektroden zu liegen oder zumindest in deren unmittelbare Nähe. Die Ernährung des Gewebes erfolgt durch Nährlösung, die von einer Zuleitung in der Mitte der Kapillare nach beiden Seiten in das Lumen strömt und nach außen abtropfen kann.

Ebenso wie beim Meßplatz für intrazelluläre Potentialmessungen konnte über einen Zweiwegehahn der Zulauf von Lösungen aus zwei Vorratsbehältern gesteuert werden. Das gesamte System wurde

von thermostatisiertem Wasser umspült, so daß sich die Nährlösung in der Kapillare auf einer Temperatur von 35°C befand.

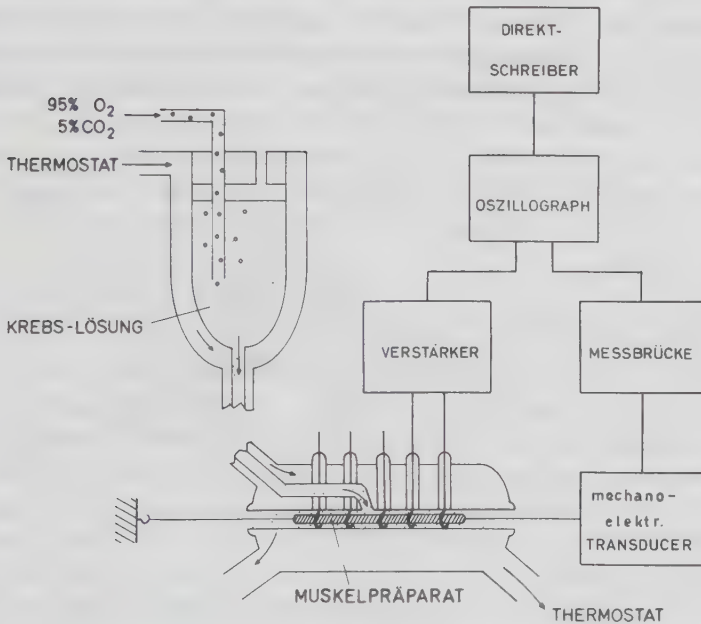


Abb. 8: Schema des Versuchsaufbaus zur extrazellulären Potentialableitung ("Kapillare")

Zur Messung der elektrischen Aktivität wurden zwei der Platinelektroden mit einem Wechselstrom-Vorverstärker (Tektronix RM 122, Beaverton, Oregon) verbunden, dessen Bandbreite auf 0,2 Hz bis 40 kHz eingestellt war. Das Ausgangssignal wurde einem Direktschreiber (Schwarzer Varioscrypt, München) zugeleitet.

Die Präparation der Muskelstreifen von 18 Meerschweinchen glich der zur Herstellung der Präparate für die Organbadversuche, wie sie in Abschnitt 2.3.1. beschrieben wurde. Die mit dem Präparat

verknüpften Fäden führten zu beiden Seiten aus der Kapillare. Ein Faden diente der Fixierung des Präparates und der andere wurde einem mechanoelektrischen Transducer zugeführt. Der Transducer war an eine Meßbrücke angeschlossen (Hellige TF 19, Freiburg). Die Vordehnung der Muskelstreifen wurde so gewählt, daß sie ihre in-situ-Länge einnahmen. Das Ausgangssignal der Meßbrücke wurde dem Direktschreiber zugeführt, so daß elektrische und mechanische Ereignisse simultan registriert werden konnten. Zur Abschirmung elektrischer Wechselfelder befand sich die Kapillare in einem nach der Vorderseite offenen Faraday-Käfig.

2.5.2. Das Saccharose-Trennwandverfahren

Bei dieser Arbeit wurde die Saccharose-Trennwandmethode (Stämpfli 1954, Burnstock und Straub 1958, Szurszewski 1974) nur für wenige orientierende Messungen des Membranpotentials herangezogen. Dazu wurde eine Saccharose-Trennwand-Anordnung benutzt, die mit geringfügigen Modifizierungen der von Boev und Golenhofen 1974 beschriebenen glich (Abb. 9). Bei dieser Apparatur wurden nach einem Vorschlag von Berger 1963 und Berger und Barr 1969 zur Verbesserung der Trenneigenschaften zwischen den einzelnen Bereichen der Saccharose-Trennwand-Anordnung elastische Gummimembranen verwendet. Durch axialen Druck konnte die konzentrische Mittelbohrung einer kreisförmigen Silikonkautschukmembran (Schütz, Schotten) in ihrem Durchmesser verändert und so dem Querschnitt des jeweiligen Muskelpräparates angepaßt werden.

Die elastischen Membranen trennen bei diesem Verfahren drei Bereiche der Anordnung voneinander ab: den durch isotone KCl-Lösung völlig depolarisierten Teil des Muskelpräparates von dem mit isotoner Saccharoselösung (315 mmol/l) umspülten mittleren Bereich, der wiederum abgegrenzt wird vom eigentlichen Testbereich des Muskelstreifens. Ein Teil des Membranpotentials kann so bipolar zwischen dem völlig depolarisierten Abschnitt und dem Abschnitt unter Testbedingungen abgenommen

werden. Zur Ableitung des Potentials wurden Agar-Ag/AgCl-Elektroden verwendet: chlorierter Silberdraht (0,5 mm $\varnothing$) wurde in Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 1 mm geschoben, die mit erstarrter Lösung von Agar in 3 M KCl gefüllt wurden. Auf diese Weise konnten Polarisationspotentiale völlig vermieden oder zumindest auf wenige mV begrenzt werden.

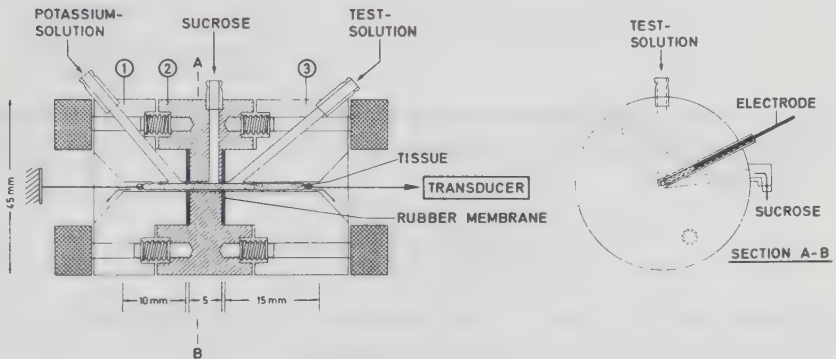


Abb. 9: Skizze der Saccharose-Trennwand-Anordnung nach Boev und Golenhofen 1974. Links: Längsschnitt, rechts: Querschnitt durch A-B

Das Meßsignal wurde über einen Impedanzwandler und Operationsverstärker (BAK, Electronic for Life Sciences, Rockville, Maryland) einem Zweistrahl-Oszillographen (Tektronix D 13, Beaverton, Oregon) und von diesem einem Direktschreiber (Schwarzer Varioscrypt, München) zugeführt. Simultan zur elektrischen Aktivität wurde die mechanische Kraftentwicklung der Muskelstreifen über einen mechanoelektrischen Transducer registriert (Swema SG 4-90, Stockholm).

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen mit der Saccharose-Trennwand-Methode stand der qualitative Vergleich mit intrazellulären Messungen im Vordergrund. Zur theoretisch möglichen

quantitativen Analyse von elektrischen Membranereignissen mit der Saccharose-Trennwand sind die hier vorgestellten Messungen nicht geeignet. Es wurden Präparate von 12 Meerschweinchen untersucht.

2.6. Statistische Verfahren

Die arithmetischen Mittelwerte $\bar{x}$ wurden nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

n = Anzahl der Meßwerte einer Stichprobe
 x_i = Meßwert innerhalb einer Stichprobe

bestimmt und sind zur Beurteilung meist mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes s_M zusammen angegeben:

$$s_M = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

Aus dem mittleren Fehler des Mittelwertes läßt sich die Standardabweichung s wie folgt berechnen:

$$s = \sqrt{n} \cdot s_M$$

Zur Beurteilung zweier Mittelwerte normalverteilter Grundgesamtheiten, die sich nur in einem Parameter unterscheiden, wurde die Signifikanz mit Hilfe eines modifizierten Student-Testes für ungleiche Stichprobenumfänge bestimmt. Der dafür erforderliche t-Wert wurde nach folgender Formel berechnet (Sachs 1974):

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Hierbei bezeichnen die Indices die entsprechenden Werte der zu vergleichenden Stichproben 1 und 2.

Die Regressionsgerade bei linearem Zusammenhang zweier Varia-

ben einer Grundgesamtheit

$$y = a + b x$$

wurde nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate maschinell (Diehl-Sigmatron, Nürnberg) bestimmt (vergl. Zurmühl 1963):

$$a = \frac{\sum x_i y_i - \bar{y} \sum x_i}{\sum x_i^2 - \bar{x} \sum x_i}$$

$$b = \bar{y} - a \bar{x}$$

Die Maschine erlaubte ebenfalls die Bestimmung des Korrelationskoeffizienten r :

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Der Korrelationskoeffizient hat aufgrund der Beziehung

$$r = b \frac{s_x}{s_y} \quad s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

das gleiche Vorzeichen wie der Regressionskoeffizient b , der die Geradensteigung angibt.

Der Standardfehler der Voraussage $s_{y \cdot x}$ von y -Werten für den Meßwert x wurde nach der Formel

$$s_{y \cdot x} \approx s_y \sqrt{1 - r^2}$$

berechnet (Sachs 1974). Damit können die Standardabweichungen der Konstanten der Regressionsgerade bestimmt werden. Die Standardabweichung für die Steigung der Regressionsgeraden

y auf x lautet

$$s_{b_{y \cdot x}} = \frac{s_{y \cdot x}}{\sqrt{\sum (x_1 - \bar{x})^2}}$$

und die für den Ordinatenabschnitt a

$$s_{a_{y \cdot x}} = s_{y \cdot x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_1 - \bar{x})^2}} = s_{b_{y \cdot x}} \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$$

Diese Werte sind in den Abbildungen 30 und 31 angegeben (Abschnitt 3.2.6.).

3. Versuchsergebnisse

3.1. Organbadversuche

3.1.1. Streifenpräparate

3.1.1.1. Die mechanische Aktivität der Magenmuskulatur

Die glatte Magenmuskulatur zeigt entsprechend der physiologischen Funktion des Magens (Cannon 1898, Code und Carlson 1968, Golenhofen et al. 1970) unterschiedliche Muster der spontanen und der Acetylcholin (ACh)-induzierten Aktivität. Die hier untersuchten anatomisch differenzierbaren Magenregionen wurden in Abb. 3 skizziert.

In Streifenpräparaten aus der Fundusregion, die beim Magen eine Reservoirfunktion innehat, überwiegt ein tonisches Aktivitätsmuster, während die Antrumregion, die Durchmischungs- und Transportaufgaben wahrnimmt, durch phasisch-peristaltische Kontraktionen geprägt ist. Die Corpusregion nimmt meist eine Zwischenstellung ein und zeigt sowohl tonische als auch phasische Komponenten der Kontraktion von Streifenpräparaten. In den Abbildungen 1 und 10 sind Originalmessungen des spontanen sowie des ACh-induzierten typischen zeitlichen Verlaufs der Kraftentwicklung zirkulärer Streifenpräparate der verschiedenen Magenregionen wiedergegeben.

3.1.1.2. Vorversuche zur Dosierung der Pharmaka und die Wirkung von TTX

Bei Vorversuchen im Organbad wurden Abschätzungen der Dosis-Wirkungsbeziehungen für ACh, NP und D600 vorgenommen. Dabei konnte auf umfangreiche Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe über die Wirkung dieser Substanzen auf verschiedene glatte Muskeln unterschiedlicher Spezies zurückgegriffen werden.

Für die Versuche mit ACh wurde eine Konzentration von 10^{-7} g/ml gewählt, wodurch deutliche Aktivierungseffekte erzielt werden konnten. Mit einer höheren Dosierung ist zwar die Initialreaktion der Aktivierung noch zu verstärken, jedoch wird dadurch die stationäre Aktivierung nicht mehr wesentlich erhöht.

Bei der Wahl der Dosis für die P- und T-Antagonisten D600 und NP wurden z.B. bereits vorliegende Ergebnisse an Magenmuskulatur und anderen Muskeln berücksichtigt, wonach bei Dosierungen von D600 und NP um 10^{-5} mol/l neben einer starken Alteration aller Komponenten der elektrischen Aktivität auch eine undifferenzierte Hemmung der mechanischen Aktivität beobachtet wurde. Beim Testen verschiedener Dosen unterhalb 10^{-5} mol/l ergab sich für NP eine optimale Wirkung bei 10^{-6} mol/l, die deutliche Hemmeffekte auf die tonische Aktivität der Muskelstreifen zeigte, ohne eine zu starke Mithemmung phasischer Kontraktionskomponenten auszuüben. Für D600 ergab sich unter entsprechenden Gesichtspunkten eine Dosis von $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l, bei der die Wirkung auf die phasische und tonische Aktivierung noch genügend unterschiedlich war.

Um auszuschließen, daß bei der Spontanaktivität oder bei der Aktivierung der Magenmuskulatur mit ACh inhibitorische oder exzitatorische nervale Einflüsse eine Rolle spielten, wurden Kontrollversuche unter Tetrodotoxin (TTX) ($3 \cdot 10^{-6}$ g/ml) durchgeführt. Es zeigte sich in völliger Übereinstimmung mit Papasova et al. 1968 und Golenhofen et al. 1970 weder in der Amplitude der Gesamtreaktion noch im zeitlichen Ablauf der Kontraktionen ein signifikanter Unterschied zu Versuchen ohne Einwirkung von TTX. In den folgenden beschriebenen Versuchen mit Streifenpräparaten wurde daher auf die Anwendung von TTX verzichtet.

3.1.1.3. Der Einfluß von Na-Nitroprussid und D600 auf die mechanische Spontanaktivität

Durch die Anwendung von NP (10^{-7} - 10^{-6} mol/l) wurden tonische Komponenten der Spontanaktivität völlig gehemmt und phasische Kontraktionen in ihrer Amplitude stark reduziert (Abb. 10, Spalte B). Gleichzeitig wurde durch NP (10^{-6} mol/l) die Frequenz der peristaltischen Wellen im Mittel von 10 Versuchen um $16 \pm 3 \%$ von $4,9 \text{ min}^{-1}$ auf $4,1 \text{ min}^{-1}$ reduziert.

NP kann die spontanen phasischen Kontraktionen von Antrumpräparaten zunächst nach der Applikation völlig blockieren, wie das im oberen Teil der Abb. 16 dargestellt ist. Dies ist ein Befund, wie man ihn von den P-Antagonisten Verapamil und D600 erwarten würde. Im Gegensatz zu diesen Substanzen zeigt sich jedoch unter der Wirkung von NP eine gewisse Adaptation des P-Systems, die im Versuch des unteren Teils der Abbildung deutlich wird: Nach einigen Minuten der Einwirkzeit von NP konnten reduzierte phasische Spontankontraktionen wieder registriert werden.

Demgegenüber ist die Wirkung von NP auf die tonische Kontraktionskomponente (T-System) dauerhaft, was ebenfalls am Beispiel des Versuches im unteren Teil der Abb. 16 erkennbar ist. Bei der Erhöhung der Konzentration des NP auf 10^{-5} mol/l wurden auch die phasischen Spontankontraktionen völlig unterdrückt.

D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) bewirkte eine dauerhafte und vollständige Unterdrückung der phasischen Kontraktionen von Antrumpräparaten. Die tonische Spontanaktivität von Funduspräparaten wurde bis zu 50 % reduziert und der Verlauf der Aktivierung, die normalerweise von kleineren phasischen Komponenten überlagert ist, geglättet (Abb. 10). Eine Erhöhung der Konzentration des D600 auf 10^{-5} mol/l führte zur vollständigen Hemmung der gesamten mechanischen Spontanaktivität von Muskelstreifen aller Magenregionen.

3.1.1.4. Untersuchungen zur 2-Phasen-Aktivierung durch Acetylcholin

Die Aktivierung der Kontraktion durch ACh (10^{-7} g/ml) verläuft in Präparaten aller drei Magenregionen in zwei Phasen: einem schnellen initialen Anstieg der Kraftentwicklung folgt eine langsamere 2. Phase, die in der Regel nach Durchlaufen eines Maximums nach etwa 4 - 6 min in einen stationären Spannungszustand der Muskulatur übergeht (Abb. 10, Spalte A). Im Mittel beträgt die 1. Phase bei Präparaten aller Regionen rund 2/3 der Maximalaktivierung (Tab. 1).

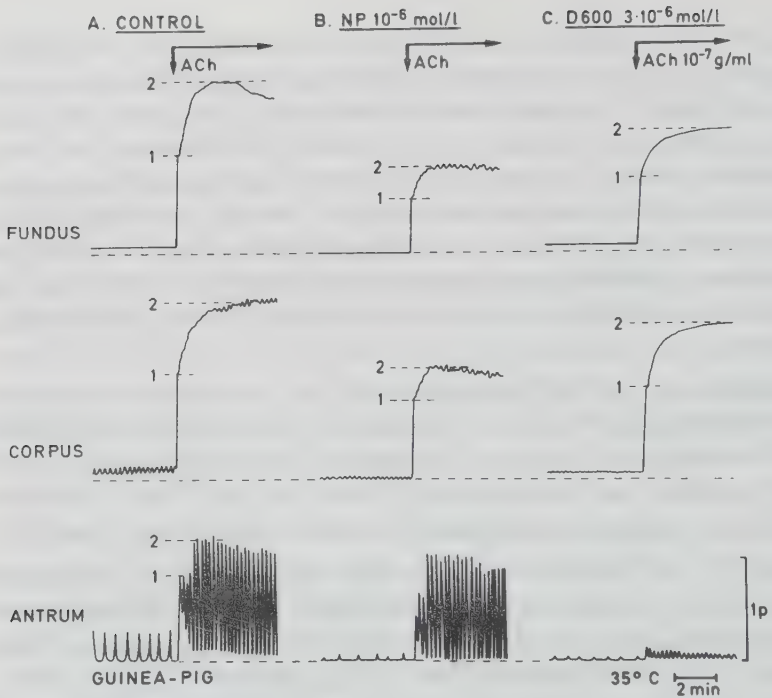


Abb. 10: Mechanogramme der Spontanaktivität und der Acetylcholin (ACh)-induzierten Aktivierung von Muskelstreifen unterschiedlicher Regionen des Meerschweinchenmagens und der Einfluß von Na-Nitroprussid (NP) und Substanz D600. Mit den Ziffern wurden die Ausschläge zweier Aktivierungsphasen gekennzeichnet.

Es wurde zunächst untersucht, ob NP oder D600 ähnlich wie bei einigen Gefäßmuskeln (Golenhofen und Weston 1976) bevorzugt eine der beiden Aktivierungsphasen unterdrückt. Jeweils 6 min nach Applikation von NP (10^{-6} mol/l) bzw. nach 12 min Einwirk-

zeit von D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) wurde eine Aktivierung der Muskelstreifen durch ACh (10^{-7} g/ml) durchgeführt.

Definiert man einen "Hemmungskoeffizienten H" wie folgt,

$$H = \frac{1}{n} \sum \frac{h_i \text{ (2. Phase)}}{h_i \text{ (1. Phase)}}$$

$h = \frac{\text{Hemmung der Kontraktion unter Wirkung d. Hemmstoffes}}{\text{Kontraktion unter Kontrollbedingungen}}$

i: Nummer des Experimentes

n: Anzahl der Experimente

so ist dessen Größe ein direktes Maß für eine bevorzugte Hemmung einer der beiden Aktivierungsphasen. Aus Tab. 1 ist ersichtlich, daß sich für die Fundus- und Corpuspräparate kein deutlicher Hinweis dafür ergeben hat, daß die Antagonisten selektiv auf unterschiedliche Phasen der Aktivierung wirken. In Präparaten beider Regionen war sowohl unter der Wirkung von NP als auch unter der von D600 der Hemmungskoeffizient $H > 1$, d.h. daß die initiale schnelle Phase von beiden Antagonisten relativ schwächer gehemmt wird als die langsamere 2. Phase.

Bei Antrumpräparaten ließen sich unter der Einwirkung der Antagonisten zwei Phasen nicht mehr sicher differenzieren.

3.1.1.5. Die Wirkungen von Na-Nitroprussid und D600 auf die Acetylcholin-induzierte Aktivität

Die weiteren Untersuchungen hatten das Ziel, die Wirkungen von NP (10^{-6} mol/l) und D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) auf das P- und T-Aktivierungssystem statistisch zu erfassen.

Dabei wurde jeweils der maximale Ausschlag einer Kontrollaktivierung der Muskelstreifen aus den verschiedenen Magenregionen mit der Reaktion unter Einwirkung der Antagonisten verglichen. Die Einwirkzeit des NP vor Applikation von ACh (10^{-7} g/ml) betrug normalerweise 6 min, bei D600 wegen der langsameren

Entfaltung seiner Wirkung 12 min. Die Maximalwerte der Kontraktion wurden vom völlig relaxierten Zustand der Muskelstreifen aus gemessen, der sich bei Calciumentzug einstellt. Da sich beim Vergleich einiger Messungen der unter Calciumentzug völlig relaxierte Zustand des Muskels auch unmittelbar nach dem Auswechseln der Organbadlösung einstellte, wurde meist dieses Niveau für die Messung der Kontraktionsaus schläge verwendet. Beispiele von Kontraktionskurven sind in Abb. 10 dargestellt; die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt.

NP unterdrückte im Mittel der Versuche 61,1 % der ACh-induzierten Kontraktion von Fundusstreifen, während die überwiegend phasisch aktiven Antrumpräparate lediglich um 33,3 % gehemmt wurden. Der Unterschied der Wirkung von NP auf Präparate dieser beiden Magenregionen ist hochsignifikant ($P < 0,0001$).

Demgegenüber entfaltete D600 eine stärkere Wirkung bei Antrumpräparaten, deren Kontraktionen im Mittel um 82,9 % gehemmt wurden; die Aktivierung von Fundusstreifen wurde um 47,4 % reduziert. Auch dieser Unterschied in der Wirkung des P-Antagonisten auf Muskelpräparate der verschiedenen Magenregionen ist hochsignifikant ($P < 0,0001$).

Vergleicht man die Wirkungen der beiden Antagonisten auf Präparate der gleichen Magenregion, so ist bei den angewandten Dosierungen die Hemmung von Antrumpräparaten durch D600 hochsignifikant stärker als die durch NP ($P < 0,0001$). An Fundusstreifen ist dagegen die Hemmung durch NP signifikant stärker als die durch D600, jedoch ist der Unterschied nicht so groß wie bei der Antrummuskulatur ($P < 0,05$). Bei Corpuspräparaten, die in dieser Versuchsreihe durch überwiegend tonische Komponenten der Aktivität geprägt waren, ist die stärker inhibitorische Wirkung des NP gegenüber dem D600 mit $P < 0,01$ ebenfalls signifikant.

	Anteil der 1. Phase (%)	Hemmung unter NP (10^{-6} mol/l) in %			Hemmung unter D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) in %				
		Maximal- kontrak- tion	1. Phase	2. Phase	Hemmungs- koeffiz. H	Maximal- kontrak- tion	1. Phase	2. Phase	Hemmungs- koeffiz. H
Fundus (n)	62,4 $\pm$ 3,6 (32)	61,1 $\pm$ 3,3 (22)	44,5 $\pm$ 5,6	68,1 $\pm$ 6,2	1,8 $\pm$ 0,3	47,4 $\pm$ 5,1 (10)	34,5 $\pm$ 8,5	46,8 $\pm$ 9,4	3,4 $\pm$ 2,3
Corpus (n)	63,6 $\pm$ 3,4 (20)	58,3 $\pm$ 6,1 (10)	49,4 $\pm$ 9,9	58,2 $\pm$ 7,8	1,5 $\pm$ 0,3	26,5 $\pm$ 6,1 (10)	17,0 $\pm$ 4,9	47,3 $\pm$ 9,3	4,7 $\pm$ 1,6
Antrum (n)	66,9 $\pm$ 2,7 (36)	33,3 $\pm$ 2,9 (26)	-	-	-	82,9 $\pm$ 3,3 (10)	-	-	-

Tab. 1: Einfluß von Na-Nitroprussid (NP) und Substanz D600 auf die Acetylcholin (10^{-7} mol/l) induzierte mechanische Aktivität. Die Testsubstanz wurde vor der ACh-Aktivierung appliziert. Alle Kontraktionsamplituden wurden vom Niveau des relaxierten Muskelpräparates aus gemessen (siehe Text). Als Hemmung ist die relative Verringerung bezogen auf die Kontrollreaktion eingetragen; Hemmungskoeffizient H nach Definition im Text.

Die Hemmwirkung des NP bei Corpus- und Funduspräparaten war bei den hier ausgewerteten Versuchen kaum unterschiedlich. Ein deutlicher Unterschied war hingegen unter der Einwirkung von D600 zwischen Fundus- und Corpuspräparaten festzustellen: Die Gesamthemmung durch D600 war bei Corpusstreifen mit 26,5 % nur etwa halb so groß wie die bei Fundusstreifen mit 47,4 %. Ein ähnlicher Unterschied zeigte sich auch bei der Hemmung der 1. Aktivierungsphase.

Muskelstreifen der distalen Antrumregion reagieren auf eine Aktivierung mit ACh häufig mit einer ausschließlichen Erhöhung von Frequenz und Amplitude der phasischen Kontraktionen bei nahezu unveränderten Werten der Kontraktionsbasis. Diese Grundlinie der Kontraktion wird bei solchen Präparaten auch durch NP nicht nennenswert beeinflusst.

Demgegenüber finden sich bei Funduspräparaten fast immer gewisse phasische Kontraktionen, die einer tonischen Grundaktivierung überlagert sind und deren Amplitude bis zu 10 % der Gesamtaktivierung erreichen kann. Unter Einwirkung von NP, wodurch das T-System gehemmt wird, können diese phasischen Kontraktionen verstärkt werden. Unter der Einwirkung von D600, das ebenfalls einen Teil der Gesamtaktivierung unterdrückt, ist der Verlauf der Restaktivierung völlig geglättet.

3.1.1.6. Die Wirkungen von Nifedipin und Diazoxid auf die mechanische Aktivität

Auf der Suche nach weiteren P- und T-Antagonisten, die möglicherweise in höherem Maße selektiv phasische oder tonische Aktivierungskomponenten am Magen unterdrücken können, wurden Nifedipin und Diazoxid getestet.

Nifedipin ist ähnlich dem Verapamil von Fleckenstein et al. 1972, Grün und Fleckenstein 1972 und Kosche et al. 1972 als Ca^{++} -Antagonist am Herzen und an Koronararterien beschrieben worden. Seine hemmende Wirkung auf die phasische Aktivität von

Gefäßmuskulatur wurde von Brecht et al. 1975 und Golenhofen und Weston 1976 beschrieben. Nifedipin erwies sich in diesen Versuchen als hochspezifischer P-Antagonist.

Die relaxierende Wirkung des Diazoxid auf arterielle Gefäße wird in der klinischen Anwendung bei der antihypertensiven Therapie ausgenutzt (Finnerty et al. 1963, Just und Stein 1969, Wessels und Losse 1969). Als Angriffsort des Diazoxid am Gefäßmuskel wurden von McNeill et al. 1969 "Calciumrezeptoren" an der Zellmembran genannt, die durch Diazoxid blockiert würden oder die Einfluß auf die Freisetzung intrazellulären oder membrangebundenen Calciums haben könnten. Golenhofen und Weston 1976 fanden, daß sowohl an der Aorta wie auch an der Ohrarterie des Kaninchens Diazoxid die Kontraktionen schwächer hemmt als NP in gleichen Konzentrationen. Daneben zeigten sich auch qualitative Unterschiede in der Wirkung, jedoch kann man bei Berücksichtigung aller Befunde Diazoxid als T-Antagonisten einordnen.

Beim Meerschweinchenmagen konnte Diazoxid nur bis zur Konzentration von 10^{-4} g/ml dosiert werden, da sein Lösungsmittel (Äthylalkohol) bei höheren Konzentrationen des Diazoxid bereits einen nicht mehr vernachlässigbaren Eigeneffekt zeigte.

Die Wirkung von Diazoxid (10^{-4} g/ml) auf die Spontanaktivität des Magens ist vergleichbar mit der von NP. In der gewählten Konzentration unterdrückte es tonische Spontankontraktionen völlig und phasische Aktivierungskomponenten zwischen 50 % und 100 %.

Bei der Untersuchung der Wirkung von Diazoxid auf die ACh-induzierte Aktivierung wurde die Substanz 4 min nach Applikation des ACh (10^{-7} g/ml) dem Organbad zugegeben. Zur Beurteilung der Hemmung wurde die Kontraktion vor Applikation mit der nach 6-minütiger Einwirkzeit verglichen.

Bei Konzentrationen bis 10^{-4} g/ml ist die Wirkung von Diazoxid auf die Magenmuskulatur im Vergleich zu der von NP (10^{-6} mol/l)

gering und undifferenziert bezüglich phasischer und tonischer Kontraktionen: Die ACh-Aktivierung von Fundusstreifen wurde im Mittel der Versuche um 28 % reduziert, die von Antrumpräparaten um 26 % (Tab. 2 und Abb. 11).

Testsubstanz	Hemmwirkung in %	
	FUNDUS (n)	ANTRUM (n)
NP (10^{-6} mol/l)	76,2 $\pm$ 2,2 (23)	56,3 $\pm$ 2,9 (21)
D600 (3 $\cdot$ 10^{-6} mol/l)	42,3 $\pm$ 8,0 (5)	90,4 $\pm$ 1,9 (6)
DIAZ (10^{-4} g/ml)	28,0 $\pm$ 6 (7)	26,0 $\pm$ 3,0 (6)
NIFED (4 $\cdot$ 10^{-7} mol/l)	30,9 $\pm$ 5,4 (11)	90,4 $\pm$ 1,9 (16)

Tab. 2: Hemmwirkung verschiedener Substanzen auf die Acetylcholin (10^{-7} g/ml) -induzierte Aktivierung von Fundus- und Antrumpräparaten des Meerschweinchenmagens. Kontraktionsamplitude vom relaxierten Zustand aus gemessen; Hemmwirkung bezogen auf Amplitude vor Applikation der Testsubstanz (n = Anzahl der Versuche)

Nifedipin scheint hingegen - wie auch an einigen anderen Muskeln - am Meerschweinchenmagen bevorzugt das P-System zu hemmen. In der Konzentration von $4 \cdot 10^{-7}$ mol/l reduziert es die von ACh (10^{-7} g/ml) induzierten phasischen Kontraktionen von Antrumpräparaten im Mittel der Versuche um 90,4 %, während die Aktivierung von Fundusstreifen lediglich um 30,9 % gehemmt wurde. Wie D600 unterdrückte auch Nifedipin am Fundus phasische Kontraktionen vollständig.

Der Einfluß von Nifedipin auf die Spontanaktivität von Magenmuskulatur ist dem von D600 vergleichbar: Während phasische Kontraktionen vollständig unterdrückt wurden, wurden tonische Spontankontraktionen um etwa 1/3 reduziert.

Vergleicht man diese Befunde mit den von D600 bewirkten Hemmeffekten (Abb. 11), so wird deutlich, daß Nifedipin bei gleicher Hemmung der phasischen Kontraktionen des Antrums die Fundusaktivität geringfügig schwächer zu hemmen scheint als D600 ($0,2 < P < 0,5$). Aufgrund dieser Ergebnisse und der an anderen Muskeln erhobenen Befunde läßt sich vermuten, daß die selektive Hemmung des P-Systems durch Nifedipin ausgeprägter als bei D600 ist. Weiterhin hat Nifedipin im Vergleich zu D600 den Vorteil, daß es seine volle Wirkung bereits 5 - 8 min nach der Applikation in das Organbad entfaltet und damit erheblich schneller wirkt als D600 (10 - 30 min). Auch die Zeitspanne, die zwischen dem Auswaschen von Nifedipin und der Rückkehr normaler Spontanaktivität vergeht, ist mit etwa 1/2 Stunde erheblich kürzer als bei D600, nach dessen Anwendung oft über mehrere Stunden keine normale Spontanaktivität mehr registriert werden konnte.

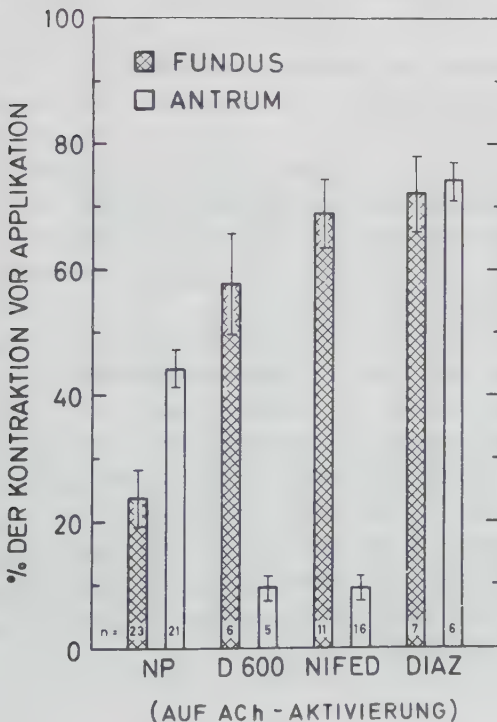


Abb. 11:

Gegenüberstellung der Hemmwirkung von Na-Nitroprussid (10^{-6} mol/l), Substanz D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l), Nifedipin ($4 \cdot 10^{-7}$ mol/l) und Diazoxid (10^{-4} g/ml) auf die Acetylcholin (10^{-7} g/ml)-induzierte Aktivität von Muskelstreifen der Fundus- und Antrumregion des Meerschweinchenmagens (Kontrollkontraktion = 100 %, n = Anzahl der Versuche)

3.1.1.7. Methodisches zur Bestimmung der Wirkung von Na-Nitroprussid

In Tab. 1 wurde als Maß für die Wirkung der Antagonisten die Reduzierung der maximalen Kontraktion der ACh-induzierten Aktivierung ausgewertet. Die Maximalkontraktionen, die normalerweise 1 - 3 min nach Zugabe von ACh in das Organbad registriert wurden, wurden meist von einer Phase mit geringerer Kraftentwicklung abgelöst (Abb. 10). Nach 4 - 6 min stellte sich dann in der Regel eine stationäre Aktivität ein. Um zu klären, ob die Größe der initialen Kontraktion und deren Hemmung auch ein Maß für die Hemmung der Daueraktivität ist, was aus Gründen der Zeitersparnis bei der Versuchsdurchführung wünschenswert ist, wurde für einige Fälle die Reduktion der initialen Maximalausschläge unter NP mit der Hemmung der stationären Aktivität verglichen. Nach einer Einwirkzeit des NP (10^{-6} mol/l) von 6 min wurde eine Aktivierung mit ACh (10^{-7} g/ml) durchgeführt und die reduzierten Ausschläge nach 4 - 6 min Einwirkzeit des ACh mit denen der entsprechenden Kontrollaktivierung verglichen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 3 enthalten.

Testregion	Hemmwirkung von NP (10^{-6} g/ml) in %	
	Maximalkontraktion	adaptierte Kontraktion
FUNDUS (n)	$61,1 \pm 3,3$ (22)	$62,1 \pm 2,8$ (24)
CORPUS (n)	$58,3 \pm 6,1$ (7)	$55,5 \pm 9,1$ (6)
ANTRUM (n)	$33,3 \pm 2,9$ (26)	$41,9 \pm 3,2$ (18)

Tab. 3: Vergleich der Hemmwirkung von Na-Nitroprussid (NP) auf die Maximalkontraktion und die adaptierten Kontraktionen der Acetylcholin (10^{-7} g/ml)-induzierten Kontraktion verschiedener Muskelpräparate des Meerschweinchenmagens (n = Anzahl der Versuche). Als Hemmwirkung wurde die relative Verringerung der Kontraktion bezogen auf die Kontrollreaktion eingetragen.

Sowohl bei Fundus- als auch bei Corpuspräparaten lag eine recht gute Übereinstimmung der Hemmung von maximaler initialer und stationärer Kontraktion vor, die sich innerhalb der Fehlergrenzen weit überdeckte. Bei Präparaten der Antrumregion liegt jedoch eine deutliche Differenz vor, die mit 8,6 % die Summe der Fehler der Mittelwerte beider Meßergebnisse übersteigt. Dazu ist anzumerken, daß sich bei Antrumpräparaten unter der Wirkung von NP im Gegensatz zu Präparaten der beiden übrigen Magenregionen der stationäre Zustand zuweilen erst nach 15 - 20 min einstellte, während bei der Erstellung der Tabellenwerte stets die Amplituden nach 10 - 12 min Einwirkzeit herangezogen wurden. Bei Antrumpräparaten wurde in einigen Fällen ein leichtes Ansteigen der Kontraktion nach längerer Wartezeit verzeichnet. Die Erklärung kann darin liegen, daß Präparate der distalen Antrumregion bei gleicher Streifenbreite eine größere Querschnittsfläche besitzen und durch erhöhte Diffusionszeiten adaptive Prozesse verzögert werden.

3.1.2. Ganzer Magen

Ergebnisse an isolierten Streifenpräparaten sind nicht in allen Fällen auf ganze Organe übertragbar. Aus diesem Grunde wurden die Wirkungen von ACh, NP und D600 auf den Innendruck von isolierten ganzen Meerschweinchenmägen getestet. Zur Ausschaltung nervaler Einflüsse, die bei ganzen Mägen eher zu erwarten sind als bei isolierten Streifenpräparaten, wurden die Versuche unter TTX ($1,7 \cdot 10^{-5}$ mol/l) durchgeführt. Es zeigte sich, daß weder die Druckgrundlinie bei etwa 1,5 - 2 cmH₂O noch die phasisch-peristaltische Aktivität in Amplitude (0,3 - 0,6 cmH₂O) und Frequenz (4 - 6 min⁻¹) durch TTX nennenswert verändert wurden.

ACh (10^{-7} - 10^{-6} g/ml) führte erwartungsgemäß zu einer gemischten phasisch-tonischen Aktivierung, die nach 4 - 6 min einen stationären Zustand um den Druck von etwa 4 cmH₂O bei leicht erhöhter Frequenz der phasischen Kontraktionen erreichte. Die Erhöhung der Grundlinie des Innendruckes ist in diesem Falle sowohl auf eine Aktivierung des T-Systems zurückzuführen, als auch auf die Erhöhung von Frequenz und Amplitude der peristaltischen

Kontraktionen. Diese führen durch die Superposition mehrerer Wellen, die gleichzeitig über die Magenmuskulatur laufen, zur Erhöhung des Innendruckes.

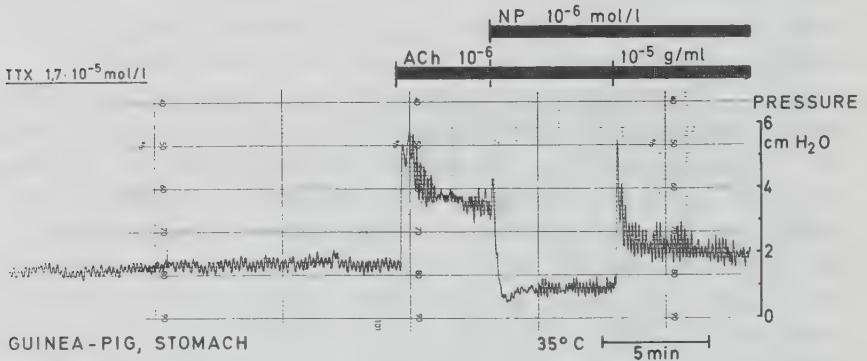


Abb. 12: Verlauf des Innendruckes eines isolierten Meerschweinchenmagens bei kumulativer Applikation von Acetylcholin (ACh) und Na-Nitroprussid (NP) unter der Wirkung von Tetrodotoxin (TTX)

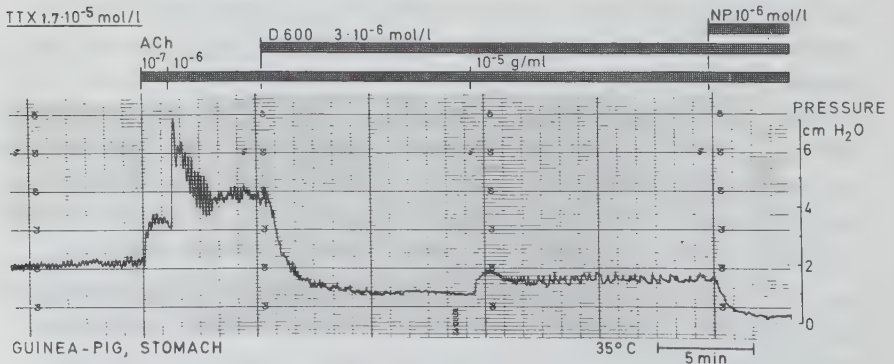


Abb. 13: Verlauf des Innendruckes eines isolierten Meerschweinchenmagens bei kumulativer Applikation von Acetylcholin (ACh), Substanz D600 und Na-Nitroprussid (NP) unter der Wirkung von Tetrodotoxin (TTX)

Wurde nach dieser Aktivierung NP (10^{-6} mol/l) dem Organbad zugegeben, sank der Gesamtdruck unter das Ausgangsniveau, ohne daß die phasischen Kontraktionen nennenswert beeinflußt wurden (Abb. 12). Die Drucksenkung kann daher überwiegend als eine Hemmung des T-Systems interpretiert werden. Die weitere Zugabe von ACh (10^{-5} g/ml) bewirkte nach einer stärkeren Initialreaktion eine dauerhafte Anhebung des Druckniveaus und eine Verdoppelung der Amplitude der phasischen Kontraktionen.

Im Versuch der Abb. 13 wurde nach der Aktivierung durch ACh (10^{-6} g/ml) der P-Antagonist D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) appliziert. Dies führte zu einer nahezu vollständigen Unterdrückung der phasischen Kontraktionen, wobei gleichzeitig der Gesamtdruck stark absank. Die Verminderung des Innendruckes ist in diesem Falle vermutlich nicht hauptsächlich durch die Hemmung des T-Systems bedingt, sondern darauf zurückzuführen, daß sowohl die Anzahl der peristaltischen Wellen, die gleichzeitig über die Magenmuskulatur laufen, als auch deren Amplitude durch D600 reduziert wurden. Durch Erhöhung der ACh-Konzentration auf 10^{-5} g/ml wurden zunächst sowohl die Amplitude der phasischen Kontraktionen als auch der Gesamtdruck schwach erhöht, wobei innerhalb von 12 min ein starker Abfall in der Frequenz der schwachen und unregelmäßigen phasischen Wellen auf $1 - 2 \text{ min}^{-1}$ zu beobachten war. Bei kumulativer Zugabe von NP 10^{-6} M wurde die tonische Aktivierung gehemmt, und die Druckkurve erreichte nahezu den Nullwert.

3.2. Elektrophysiologische Untersuchungen

3.2.1. Spontane elektrische Aktivitätsmuster der Magenmuskulatur des Meerschweinchens

Entsprechend der unterschiedlichen Muster der spontanen sowie der ACh-induzierten Kraftentwicklung zeigt auch das Membranpotential der glatten Magenmuskulatur Muster, die für die verschiedenen Magenregionen charakteristisch sind (Golenhofen et al. 1970, Kuriyama et al. 1970, Ito und Kuriyama 1975, Prosser 1974b).

Bei Funduspräparaten findet man häufig Spike-Entladungen, die kleinen, etwa sekundenrhythmischen Oszillationen des Membranpotentials überlagert sind (Abb. 27). Die Spikes haben eine Höhe von etwa 30 - 50 mV, die Amplituden der sekundenrhythmischen Oszillationen, die als das auslösende Signal für die Spikes gelten, betragen einige mV. Bei Antrumpräparaten hingegen treten deutliche langsame sinusoidale Schwankungen des basalen Membranpotentials auf, die eine Höhe bis zu 40 mV erreichen können und im peristaltischen Rhythmus ablaufen. Bei meist oberflächlich anzufindenden Zellen finden auf den Wellenbergspike-Entladungen statt, deren Frequenz normalerweise das zwei- bis dreifache der Spikefrequenz im Fundusbereich beträgt und 180 min^{-1} erreichen kann. Die Gesamtgröße der Änderung des Membranpotentials, die sich durch Superposition der einzelnen Komponenten ergibt, kann im Antrum bis zu 80 mV erreichen.

Präparate der Corpusregion nehmen im elektrischen Bild ebenso wie im mechanischen eine Mittelstellung zwischen Fundus- und Antrumpräparaten ein. Sie zeigen normalerweise im Vergleich zum Antrum niedrigere Amplituden der langsamen Wellen des basalen Membranpotentials, die bis zu kaum erkennbaren Fluktuationen verflachen können. Flache langsame Wellen können von Spike-Dauerentladungen überlagert sein, die sich im Rhythmus der Peristaltik verdichten. Diese Ergebnisse befinden sich in guter Übereinstimmung mit den von Golenhofen et al. 1970 veröffentlichten Befunden am Meerschweinchenmagen.

In tiefer liegenden Zellschichten der Antrumpräparate ist ein weiterer Zelltyp zu finden, der in normaler Nährlösung zwar die langsamen Wellen des basalen Membranpotentials, aber keine spontanen Spike-Entladungen zeigt. Da der Spike-Prozeß sehr empfindlich auf Störungen durch z.B. zu dicke Elektroden reagiert, könnte diese Differenzierung der Zelltypen auch auf Meßfehler zurückzuführen sein. Dieser Einwand kann allerdings dadurch entkräftet werden, daß bei einigen Versuchen mit derselben Mikroelektrode zuerst oberflächlich liegende Zellen mit Spike-Entladungen gefunden wurden, und bei darauffolgender Pe-

netration in tieferen Schichten Spike-freie Ableitungen des Membranpotentials registriert wurden. Bei neuerlichen Penetrationen mit derselben Elektrode an der Oberfläche wurden wieder Spike-Entladungen registriert. Außerdem wurden beide Muster des Membranpotentials ebenfalls bei extrazellulärer Ableitung mit Hilfe des Saccharose-Trennwandverfahrens nachgewiesen.

Beispiele der elektrischen Spontanaktivität "spikender" und "nicht spikender" Zellen sind in Abb. 14 und 15 dargestellt. In beiden Abbildungen sind Messungen mit der Saccharose-Trennwand-Anordnung und intrazelluläre Potentialableitungen abgebildet.

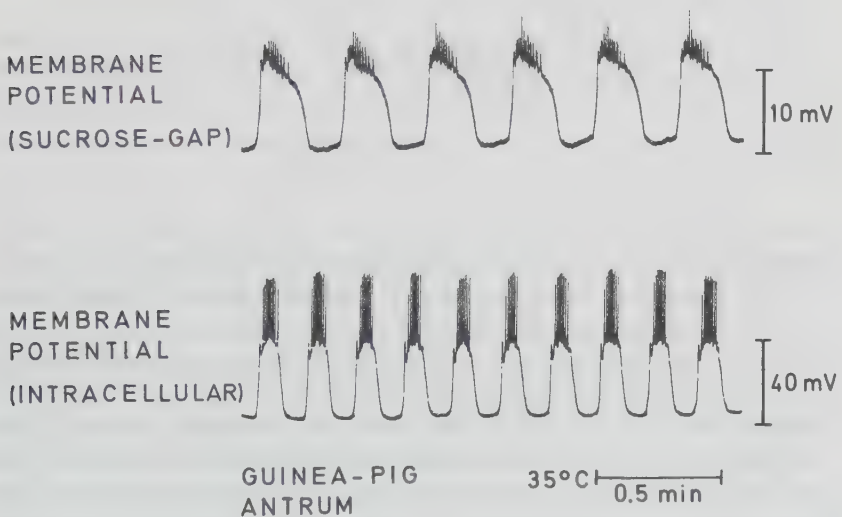


Abb. 14: Elektrische Spontanaktivität von Muskelpräparaten aus der Antrumregion, mit Spike-Entladungen. Oben: Extrazelluläre Potentialableitung mit Hilfe des Saccharose-Trennwandverfahrens. Unten: intrazelluläre Potentialableitung

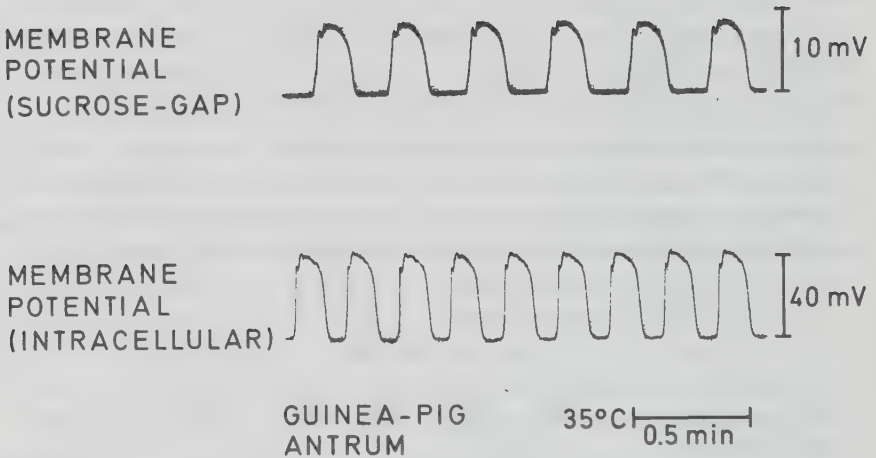


Abb. 15: Elektrische Spontanaktivität von Muskelpräparaten aus der Antrumregion, ohne Spike-Entladungen. Oben: Extrazelluläre Potentialableitung mit Hilfe des Saccharose-Trennwandverfahrens. Unten: intrazelluläre Potentialableitung

Bemerkenswert ist, daß in den Messungen der Abb. 14 und 15 die aufsteigende Flanke der Wellen des basalen Membranpotentials steiler als die abfallende Flanke verläuft. Diese Form des basalen Membranpotentials wurde auch in Berichten von Daniel 1965, Daniel und Irwin 1968, Papasova et al. 1968 und bei Kuriyama et al. 1975 dargestellt. In den eigenen Versuchen wurde dies jedoch nicht generell bei allen Messungen festgestellt; z.B. unterscheiden sich in den Abb. 16, 17 und 19 die Steigungen der aufsteigenden nicht wesentlich von denen der abfallenden Flanken des basalen Membranpotentials. Auch die Zacke, mit der am Magen die aufsteigende Flanke der "slow waves" oft endet und auf die Tomita und Watanabe

1973 hinwiesen, ist zwar in der Mehrzahl der vorliegenden Messungen, jedoch nicht in allen Fällen registriert worden.

Um bei den Untersuchungen der Aktivierungssysteme möglichst Aussagen über die Beeinflussung aller Komponenten der elektrischen Aktivität zu erhalten, wurden meist Zellen mit Spike-Entladungen penetriert. In einigen Testuntersuchungen wurde jedoch festgestellt, daß die Zellen ohne spontane Spike-Entladungen auf die hier untersuchten Substanzen bezüglich des basalen Membranpotentials ähnlich reagierten.

3.2.2. Der Einfluß von Na-Nitroprussid und D600 auf die elektrische Spontanaktivität

NP (10^{-7} - 10^{-6} mol/l) hemmt mit der mechanischen Spontanaktivität von Antrumpräparaten die Spike-Entladungen bis zur völligen Unterdrückung, ohne die Form der langsamen basalen Wellen des Membranpotentials zu beeinflussen. Gleichzeitig bewirkt NP eine Hyperpolarisation der Membran von 5 - 10 mV ($6,0 \pm 1,1$ %, n = 6).

Abb. 16 gibt in ihrem Teil A ein Beispiel dieses Effektes, der abgesehen von der Hyperpolarisation ähnlich unter der Wirkung der P-Antagonisten Verapamil und D600 zu beobachten ist (Golenhofen und Lammel 1972, Riemer et al. 1974a, vergl. Abb. 19 und 21). Der Unterschied liegt darin, daß die bereits bei der Besprechung der Organbadversuche erwähnte Adaptation des Gewebes an NP ebenfalls im elektrischen Bild sichtbar wird. Der untere Teil B der Abb. 16 zeigt Ausschnitte aus einer kontinuierlichen Messung bei extrazellulärer Potentialableitung. Auch in diesem Falle war unmittelbar nach der Applikation von NP eine stärkere Hemmung der Spontanaktivität aufgetreten. Aber sowohl die mechanische als auch die elektrische Aktivität erholten sich wieder. Nach 12 min Einwirkzeit des NP wurden Spikes in reduzierter Folgefrequenz und Anzahl pro Kontraktionswelle registriert.

Ein weiterer Unterschied in der Wirkung des P-Antagonisten D600 und des T-Antagonisten NP ist darin zu sehen, daß sich die Wirkung von NP durch ACh leichter kompensieren läßt. Die Tatsache, daß D600 bzw. Verapamil ein potenter Spike-Antagonist ist, wurde von Golenhofen et al. 1973, Golenhofen und Wegner 1972 und 1975

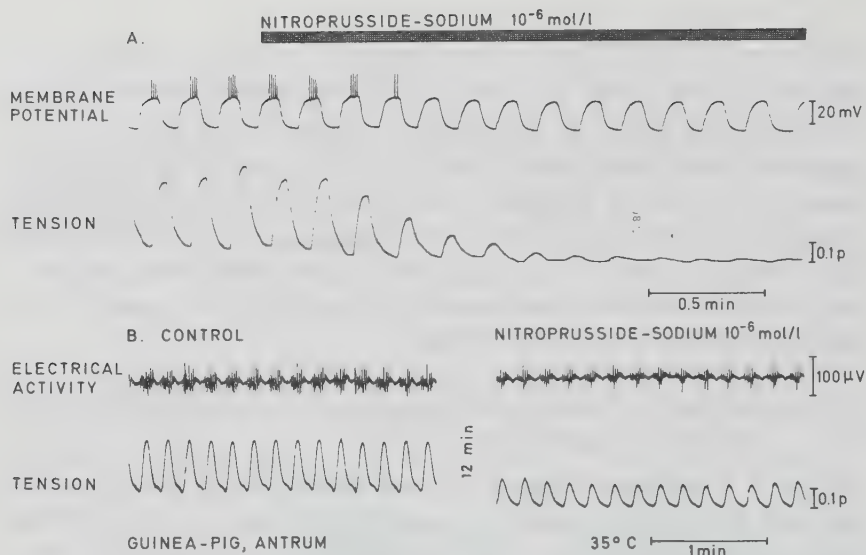


Abb. 16: Simultane Registrierung der elektrischen und mechanischen Aktivität von Antrumpräparaten bei Applikation von Na-Nitroprussid. Teil A: Intrazelluläre Potentialableitung. Teil B: Ausschnitte aus einer kontinuierlichen extrazellulären Potentialableitung mit Hilfe der "Kapillare"; zwischen beiden Ausschnitten liegt eine Zeit von 12 min

und Golenhofen und Hermstein 1973 zur Demaskierung eines Spike-freien Aktivierungsmechanismus unter der Wirkung von ACh bzw. Noradrenalin verwendet. Unter der Wirkung von NP sind demgegenüber mit ACh Spike-Entladungen am Magen induzierbar, was am Beispiel einer intrazellulären Potentialableitung in Abb. 17 und bei extrazellulärer Potentialableitung mit Hilfe der Kapillare in Abb. 18 dargestellt wurde. Bei Einwirkung von D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) sind selbst durch ACh (10^{-6} g/ml) keine Spikes induzierbar, wie am Beispiel der intrazellulären Messung in Abb. 19 erkennbar ist (vergl.: Mayer et al. 1972).

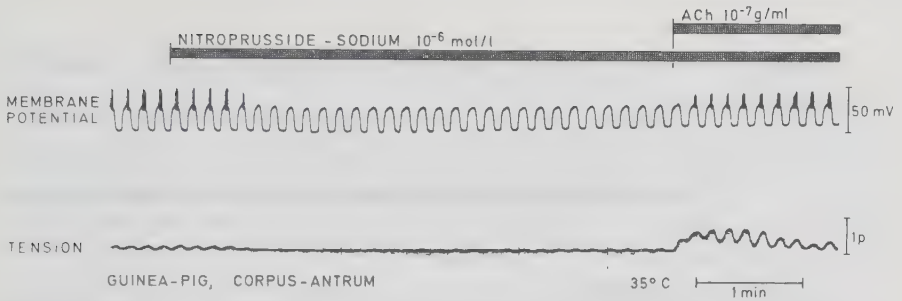


Abb. 17: Intrazelluläre Potentialableitung bei simultaner Registrierung der mechanischen Aktivität an einem Muskelpräparat der distalen Corpusregion des Meerschweinchenmagens unter Einwirkung von Na-Nitroprussid und Acetylcholin (ACh)

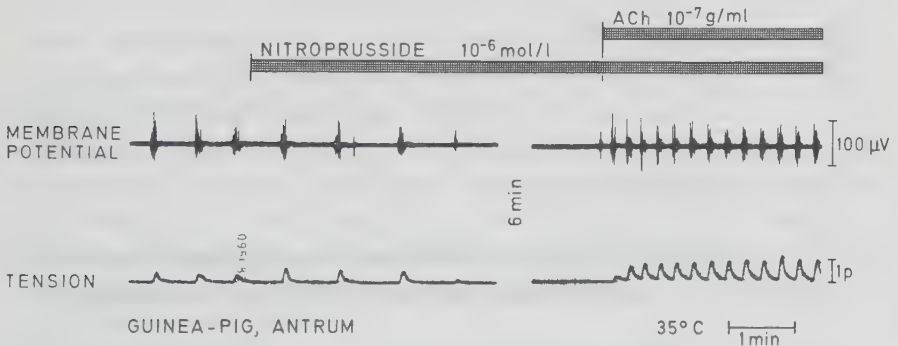


Abb. 18: Ausschnitte aus einer kontinuierlichen simultanen Registrierung der elektrischen und mechanischen Aktivität eines Muskelstreifens der Antrumregion unter der Wirkung von Na-Nitroprussid und Acetylcholin (ACh); extrazelluläre Potentialableitung mit Hilfe der "Kapillare"

In Abb. 20 ist eine Messung mit Hilfe der "Kapillare" wiedergegeben. Bei diesem Versuch wurden die durch ACh (10^{-7} g/ml) in erhöhter Frequenz auftretenden Spikes sowie die phasischen Kontraktionswellen durch D600 gehemmt und konnten auch durch eine Erhöhung der ACh-Konzentration auf 10^{-6} g/ml nicht wieder induziert werden. Demgegenüber konnte unter diesen Bedingungen ebenso wie im Versuch von Abb. 19 eine Spike-freie tonische Aktivierung her-

vorgerufen werden, die mit einer Depolarisation der Zellmembran verbunden war.

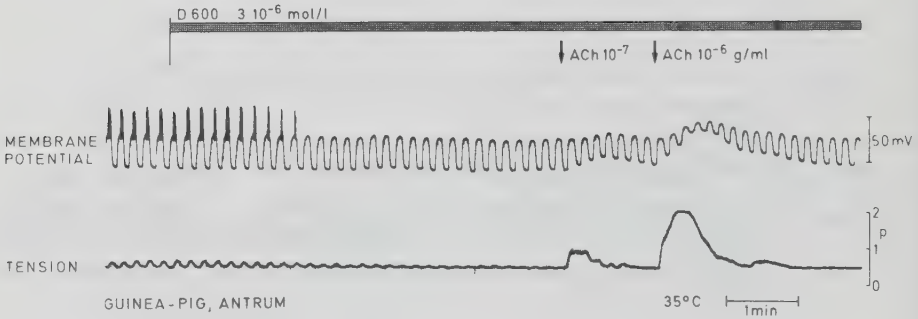


Abb. 19: Intrazelluläre Potentialableitung bei simultaner Registrierung der mechanischen Aktivität eines Muskelpräparates der Antrumregion unter der Einwirkung von Substanz D600 und kumulativ in die Meßkammer eingetropftem Acetylcholin (ACh)

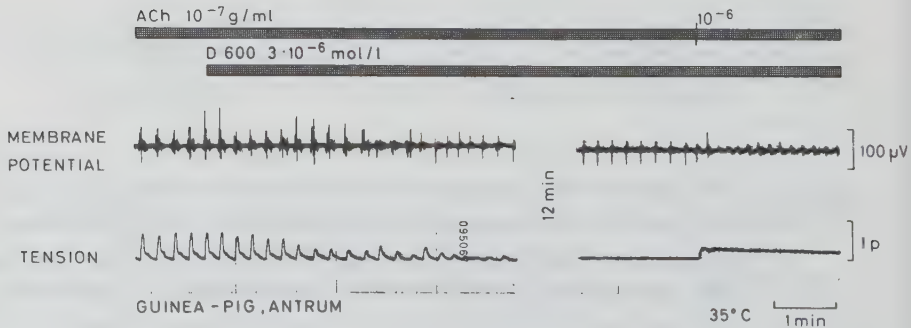


Abb. 20: Ausschnitte einer kontinuierlichen simultanen Registrierung der Acetylcholin (ACh)-induzierten elektrischen und mechanischen Aktivität eines Antrumpräparates bei Applikation von Substanz D600; extrazelluläre Potentialableitung mit Hilfe der "Kapillare"

3.2.3. Das Membranpotential bei Calcium-Entzug

In 5 Versuchen wurde die Wirkung des Entzugs von Calcium im Vergleich zu der Wirkung des " Ca^{++} -Antagonisten" D600 (Fleckenstein et al. 1967, 1968, 1969, 1971, Mayer et al. 1972, Golenhofen et al. 1973) getestet. Ein Beispiel zeigt Abb. 21. Bereits 2 - 3 min nach Beginn des Zuflusses Ca^{++} -freier Nährlösung in die Meßkammer verschwanden die Spike-Entladungen sowie die phasischen Kontraktionen von Antrumstreifen. Gleichzeitig setzte eine Depolarisation der Zellmembran bei Verringerung der Amplitude der langsamen Potentialwellen ein, die bei längerer Exposition bis zum völligen Abbau des Membranpotentials führte. Auch unter D600 wurden nach wenigen Minuten die Spike-Entladungen und die phasischen Kontraktionen unterdrückt. Im Unterschied zum Calciumentzug trat jedoch unter D600 bei diesem Experiment ebenso wie im Mittel von weiteren 8 intrazellulären Ableitungen keine Depolarisation der Zellmembran ein.

In dem Beispiel der Abb. 22 wurde ein Antrumpräparat nach 3-minütigem Ca^{++} -Entzug wieder mit normaler Nährlösung versorgt. Nach weiteren 3 min waren normale Spike-Entladungen wieder zurückgekehrt. Die nach dieser Zeit noch um etwa 8 mV depolarisierte Zelle stellte nach etwa weiteren 3 min wieder ihr ursprüngliches Membranpotential ein.

Demgegenüber führte NP 10^{-6} mol/l zur Hyperpolarisation der Zellmembran um einige mV (Abb. 16, Abschnitt 3.2.2.).

Sowohl Ca^{++} -Entzug als auch D600 hemmen die phasische mechanische Aktivität von Antrumpräparaten vollständig; diesbezüglich sind die Wirkungen von Calciumentzug und die Applikation von D600 in genügend hohen Dosen nicht unterscheidbar. In diesem Sinne wirkt D600 am Magen als Ca^{++} -Antagonist (vergl. Golenhofen und Lammel 1972, Golenhofen und Wegner 1975). Die entsprechende Aussage trifft auch auf die Wirkung von NP auf die Magenmuskulatur zu: auch hier zeigt erst die Ableitung des Membranpotentials den Unterschied zwischen der Wirkung von Calciumentzug und der von NP.

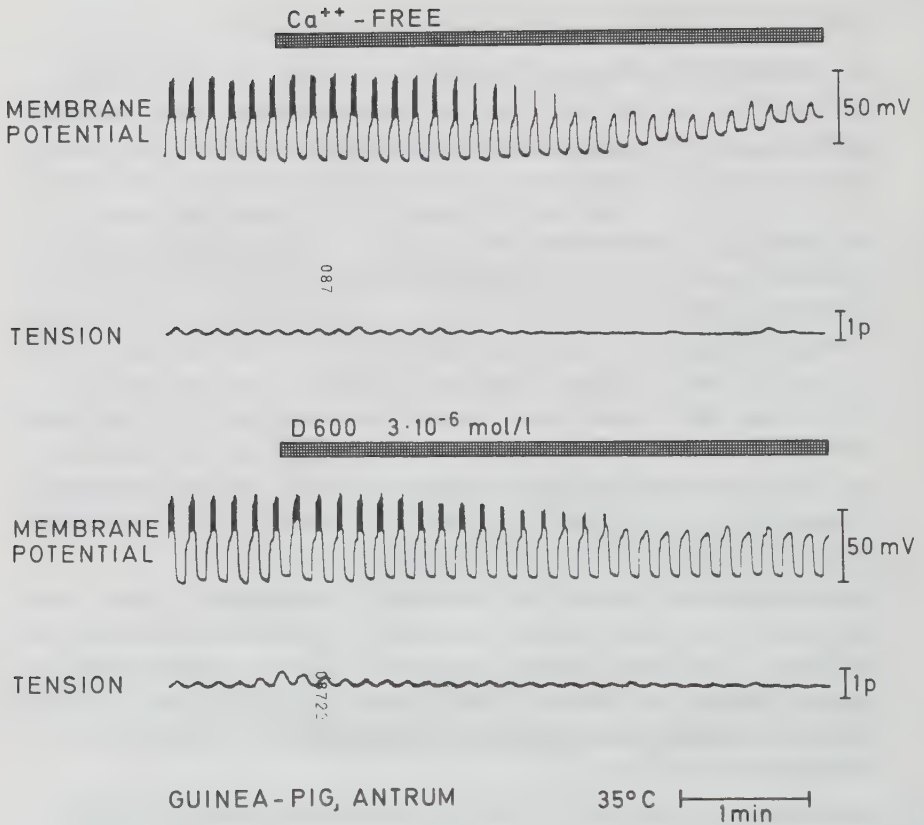


Abb. 21: Simultane Registrierungen der intrazellulär abgeleiteten elektrischen und der mechanischen Aktivität eines Antrumpräparaten unter dem Einfluß von Ca⁺⁺-freier Nährlösung (oben) und Substanz D600 (unten); Ausschnitte aus demselben Versuch

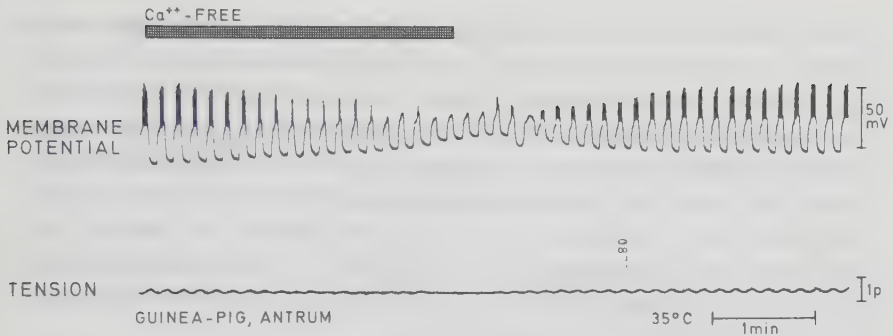


Abb. 22: Simultane Registrierung der intrazellulär abgeleiteten elektrischen und der mechanischen Aktivität eines Antrumpräparates bei vorübergehendem Ca⁺⁺-Entzug

3.2.4. Der Einfluß von Acetylcholin auf die elektrische Aktivität

Die Wirkung des ACh auf das Membranpotential ist bereits ausführlich beschrieben worden (Bülbring 1954, Burnstock 1958, Kuriyama et al. 1970, Bolton 1972, 1973 und 1975, Szurszewski 1974, Golenhofen und Wegner 1975).

ACh beeinflusst sowohl die langsamen Wellen des basalen Membranpotentials als auch die Spike-Entladungen, wie es im Beispiel von Antrummuskulatur in Abb. 23 erkennbar ist: Mit einer deutlichen Depolarisation der Zellmembran um rund 20 mV erhöhte sich gleichzeitig sowohl die Spikefrequenz als auch die Anzahl der Spikes pro langsame Welle. Die Gipfelpunkte der langsamen Wellen wurden dabei nur geringfügig und vorübergehend angehoben, so daß unter ACh die Amplitude der langsamen Wellen verringert wurde. Nicht selten verschwanden in einer Initialreaktion die langsamen Wellen völlig, während gleichzeitig Spike-Dauerentladungen mit hoher Frequenz beobachtet werden konnten. Die Form und Höhe der Spikes wurde bei dem in Abb. 23 dargestellten Versuch nicht beeinflusst.

Bei 20 Versuchen, die in diesem Zusammenhang ausgewertet wurden, führte in 13 Fällen ACh (10^{-7} g/ml) zu einer geringen Erhöhung der Frequenz der langsamen Potentialwellen bzw. der phasischen Kontraktionen von Antrumpräparaten um etwa 10 - 30 %. Der frequenzsteigernde Effekt von ACh ist besonders deutlich bei Präparaten mit niedriger Ausgangsfrequenz und trat nicht bei allen Versuchen auf (Kuriyama et al. 1970, Golenhofen und Wegner 1975). Im Gegensatz zu Kuriyama et al. 1970 und in Übereinstimmung mit Golenhofen und Wegner 1975 bewirkte ACh jedoch in allen Fällen eine Erhöhung der Spikefolgefrequenz.

Die bei intrazellulären Ableitungen des Membranpotentials aus Einzelzellen gefundene Wirkung von ACh ist durch extrazelluläre Meßmethoden zu bestätigen. Der in der "Kapillare" durchgeführte Versuch mit einem Antrumpräparat (Abb. 24) zeigt sowohl die Erhöhung der Frequenz der phasischen Kontraktionen als auch die Erhöhung der Anzahl der Spikes pro "burst" sowie der Spikefolgefrequenz. Der in der Saccharose-Trennwand-Anordnung durchgeführte Versuch der Abb. 25 mit einem Antrumpräparat liefert ein qualitativ gleiches Bild wie die intrazelluläre Potentialableitung in Abb. 23.

Die Wirkungen von ACh auf das Membranpotential von Funduspräparaten zeigen bei intrazellulärer Ableitung die Abb. 27 und bei extrazellulärer Ableitung mit der "Kapillare" Abb. 28. Deutlich ist in beiden Abbildungen die Erhöhung der Spikefolgefrequenz zu erkennen. Im Mittel von 9 Versuchen ist eine leichte Depolarisation der Zelle um etwa 8 mV festzustellen, die jedoch bei gleicher ACh-Konzentration geringer als in Antrumpräparaten ist. Bei allen Messungen wurde normalerweise nach einigen Minuten unter der Wirkung von ACh eine leichte Adaptation registriert, während der sich alle Komponenten der Initialreaktion bis zu einem gewissen Grade zurückentwickelten.

3.2.5. Die Wirkung von Na-Nitroprussid und D600 auf die Acetylcholin-induzierte elektrische Aktivität

Bei der Intensivierung der Aktivität durch ACh entfaltete NP

eine ähnliche Wirkung wie im Falle der Spontanaktivität. Abb. 23 zeigt die Wirkung von NP auf ein Antrumpräparat unter der Einwirkung von ACh am Beispiel einer intrazellulären Ableitung des Membranpotentials, dessen einzelne Komponenten durch die Wiedergabe von einem Bandspeicher mit unterschiedlicher zeitlicher Auflösung dargestellt wurden.

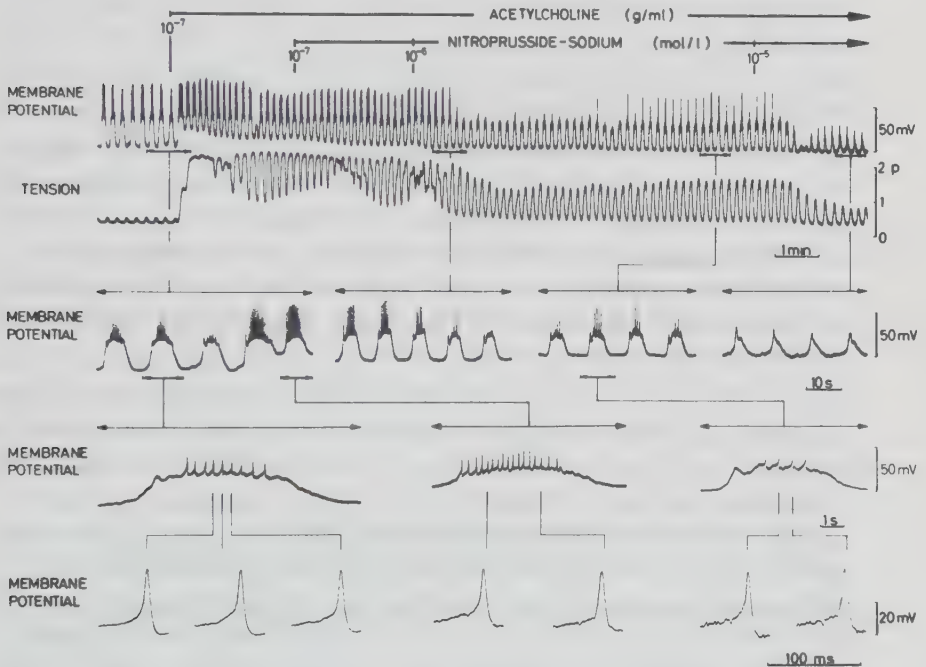


Abb. 23: Simultane Registrierung einer intrazellulären Potentialableitung und der mechanischen Aktivität von Antrummuskulatur unter der Wirkung von Acetylcholin (ACh) und Na-Nitroprussid (NP). Die jeweils markierten Teile der Potentialableitung sind nach unten hin zunehmend zeitlich aufgelöst dargestellt (Wiedergabe vom Bandspeicher).

Die Abbildung zeigt zunächst eine normale Reaktion auf ACh (10^{-7} g/ml). Nach 3 min Einwirkzeit des ACh kam NP kumulativ in steigenden Konzentrationen zur Anwendung. NP 10^{-7} mol/l bewirkte zwar eine schwache Repolarisation der Zelle, blieb jedoch darüber hinaus ohne nennenswerte Wirkung auf die elektrische Aktivität. Mit NP 10^{-6} mol/l wurde die durch ACh bewirkte Depolarisation der Zellmembran völlig rückgängig gemacht. Gleichzeitig wurden die Spike-Entladungen in Folgefrequenz und Anzahl pro Potentialwelle gehemmt und schließlich völlig unterdrückt. Die langsamen Wellen blieben in ihrer Form unverändert, jedoch wurde ihre Frequenz reduziert.

Wie der Verlauf des Membranpotentials zeigt, wurden nach wenigen Spike-freien langsamen Wellen zunächst wieder einzelne, dann nach 4 - 5 min etwa 2 - 4 Spikes pro Potentialwelle registriert. Der Adaptationsprozeß führte gleichzeitig zu der bereits oben beschriebenen Erhöhung der Amplitude der phasischen Kontraktionen. Die anfänglich angehobene Ausgangslinie der Kontraktionen ging auf das Ausgangsniveau zurück.

Die Einzeldarstellung von Spikes, die bei unterschiedlichen Bedingungen registriert wurden, macht sichtbar, daß NP weder die Höhe noch die Form des Spikes beeinträchtigte. In den Fällen, wo während der Initialreaktion keine Spikes gemessen wurden, konnten die sekundenrhythmischen Oszillationen noch registriert werden. Dies sind wichtige Unterschiede zur Wirkung der P-Antagonisten Verapamil und D600, die den Spike selbst verformen und schließlich einschließend der sekundenrhythmischen Oszillationen unterdrücken (Golenhofen und Lammel 1972, Riemer et al. 1974a, Golenhofen und Wegner 1975).

Bei Erhöhung der NP-Konzentration auf 10^{-5} mol/l wurden die Spikes rasch blockiert und die Form der langsamen Wellen wurde stark verändert. Im weiteren Verlauf des Versuches, der in Abb. 23 nicht mehr dargestellt ist, kam die mechanische Aktivität nahezu vollständig zum Erliegen; innerhalb weiterer 6 min stellte

sich weder die Normalform der langsamen Wellen wieder ein, noch konnten Spike-Entladungen registriert werden. Mit dieser Konzentration war offensichtlich der spezifische Wirkungsbereich des NP überschritten.

Extrazelluläre Ableitungen des Membranpotentials zeigen bei ähnlichen Versuchen Abb. 24 ("Kapillare") und Abb. 25 (Saccharose-Trennwand-Verfahren). Bei dem in Abb. 24 aufgezeichneten Versuch mit einem Antrumpräparat waren selbst unter der Wirkung von NP 10^{-5} mol/l noch Spike-Entladungen nachzuweisen, deren Anzahl pro Welle jedoch stark vermindert war. Auch die in Abb. 23 und Abb. 25 beobachtbare vorübergehende Blockade der Spikes ist bei diesem Versuch nicht sichtbar. Neben der biologisch möglichen Variabilität kann dies darauf zurückzuführen sein, daß bei der Potentialableitung in der "Kapillare" nicht einzelne Spikes gemessen werden, sondern die Summenaktivität schneller elektrischer Ereignisse in einem größeren Zellverband, zu der auch abortive Spikes und sekundenrhythmische Oszillationen beitragen können. Grundsätzlich wurden jedoch auch unter der Wirkung von ACh und NP durch die Messungen mit der "Kapillare" die Ergebnisse der intrazellulären Potentialableitungen qualitativ bestätigt.

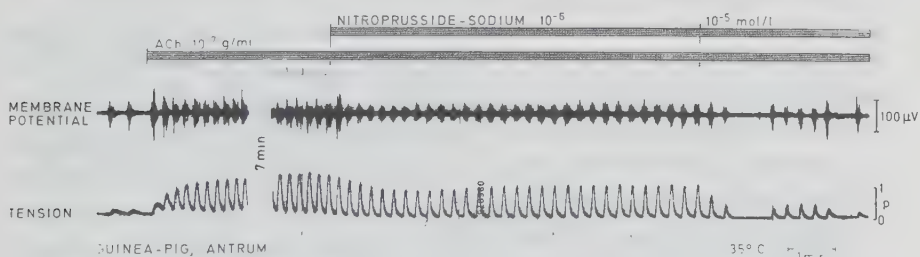


Abb. 24: Registrierung der elektrischen und mechanischen Aktivität eines Antrumpräparates unter dem Einfluß von Acetylcholin (ACh) und Na-Nitroprussid (NP); extrazelluläre elektrische Potentialableitung mittels der "Kapillare"

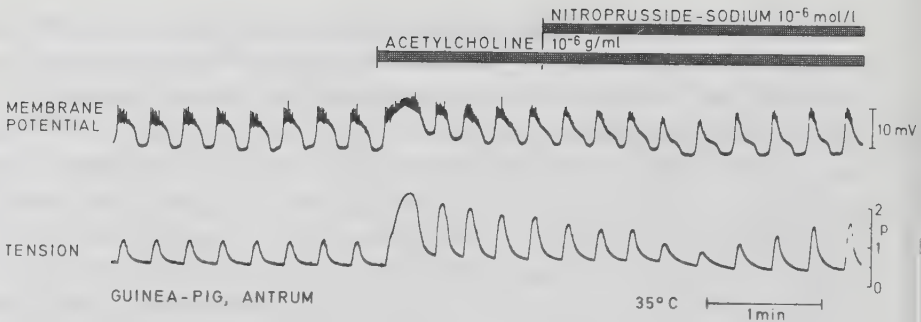


Abb. 25: Simultane Registrierung von elektrischer und mechanischer Aktivität eines Antrumpräparates unter der Wirkung von Acetylcholin und Na-Nitroprussid (Saccharose-Trennwandverfahren)

Abb. 26 zeigt eine fortlaufende Registrierung aus einem Versuch mit Hilfe der Saccharose-Trennwand-Anordnung, bei dem kumulativ nach ACh und NP der P-Antagonist D600 appliziert wurde. Auch bei dieser Messung an einem Antrumstreifen wurden durch NP zunächst die Spike-Entladungen blockiert und die Amplituden der phasischen Kontraktionen stark reduziert. Mit der Repolarisation der Zellmembran ging die tonische Komponente der ACh-Aktivierung auf ihren Ausgangswert zurück. Nach 6 min hatten dann sowohl die Spike-Entladungen als auch die Ausschläge der Kontraktionen nahezu das Maß wieder erreicht, das sie vor Zugabe von NP hatten. Erst D600 führte zu einer völligen Blockade der Spikes und der phasischen Kontraktionen. Die bei diesem Versuch registrierte Depolarisation unter D600 wurde bei 2 weiteren Versuchen mit derselben Meßmethode nicht beobachtet.

An Funduspräparaten bewirkt NP nach einer ACh-Aktivierung eine Hemmung der Spike-Entladungen und eine deutliche Re- bzw. Hyperpolarisation der Zellmembran. Dafür gibt der obere Teil von Abb. 27 ein Beispiel. Nach Zugabe von NP 10^{-7} mol/l wird die durch ACh erhöhte Spikefolgefrequenz zunächst reduziert, und nach etwa 1,5 min werden die Spikes völlig blockiert. Befunde dieser Art dienen oft als Nachweis dafür, daß der Spike der nor-

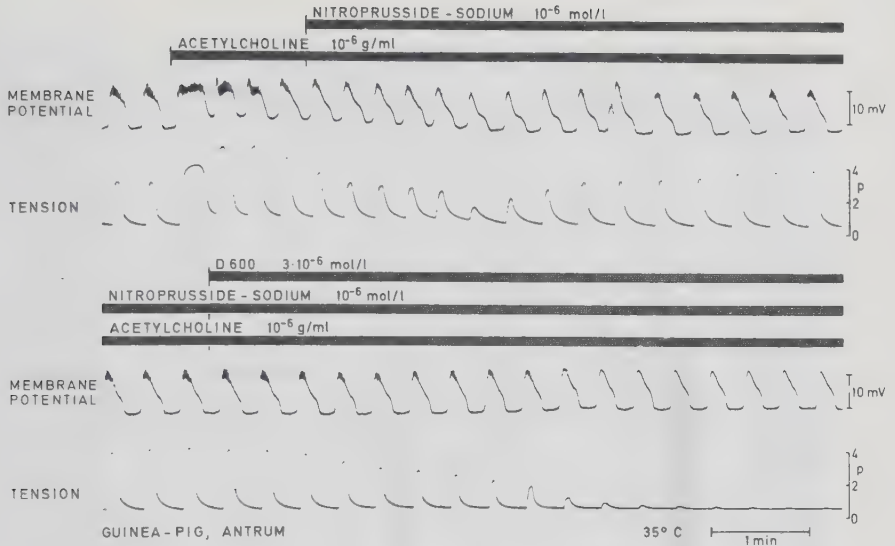


Abb. 26: Fortlaufende simultane Registrierung der elektrischen und mechanischen Aktivität von Antrumsmuskulatur bei kumulativer Applikation von Acetylcholin, Na-Nitroprussid und Substanz D600; Ableitung des Membranpotentials mit Hilfe des Saccharose-Trennwand-Verfahrens

male Auslöser der Kontraktion sei (vergl. Einleitung). Daß die Hemmung des T-Systems jedoch nicht an die Blockade von Spikes gebunden ist, zeigt der untere Teil von Abb. 27. Hier wurde nach der Aktivierung eines Funduspräparates durch ACh zunächst D600 appliziert, was wie im Beispiel darüber nach etwa 1 min die Spike-Entladungen völlig blockierte. Im Unterschied zum oberen Versuch wurde dadurch bei diesem Experiment die tonische Aktivierung nur leicht reduziert - im Mittel der Versuche entsprechend Tab. 2 nach genügend langer Einwirkzeit des D600 um 47 %. Erst durch NP wurde die verbleibende Spike-freie tonische Aktivierung unterdrückt, begleitet wie im oberen Versuch durch eine Re- und Hyperpolarisation der Zellmembran.

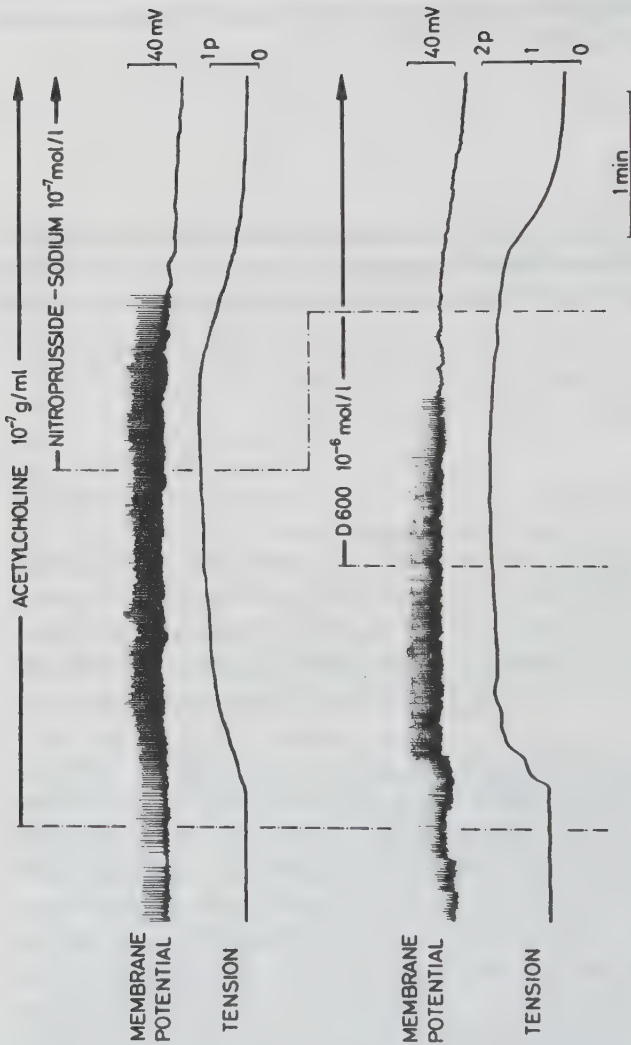


Abb. 27: Simultane Registrierung der elektrischen und mechanischen Aktivität eines Funduspräparates (intrazelluläre Potentialableitung). Oben: Wirkung von Na-Nitroprussid auf die Acetylcholin-induzierte Aktivierung. Unten (10 min später): Wirkung von Substanz D600 auf die Acetylcholin-induzierte Aktivierung mit anschließender Applikation von Na-Nitroprussid (Zeitpunkt der Applikation durch ---- gekennzeichnet).

Die unterschiedlichen Effekte von D600 und NP auf den Spike-Mechanismus zeigen sich auch im Vergleich der beiden in Abb. 27 dargestellten Kurven. Während durch NP die Spikefolgefrequenz reduziert wurde, ohne daß bis zum Abbruch der Spike-Entladungen Höhe und (bei entsprechender Wiedergabe vom Bandspeicher) Form der Spikes beeinflußt wurden, veränderte D600 neben der Folgefrequenz auch die Höhe und Ablaufsform der Spikes. Dies ist neben den in Abb. 23 dargestellten Ergebnissen ein Hinweis darauf, daß die beiden Substanzen in unterschiedlicher Weise die Spike-Entladungen beeinflussen.

Abb. 28 gibt einen Versuch wieder, der in der "Kapillare" unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurde wie der im oberen Teil von Abb. 27. Auch dieser Versuch zeigt, daß NP zwar die Spike-Entladungen hemmen kann, aber nicht in allen Zellen des Präparates unterdrückt.

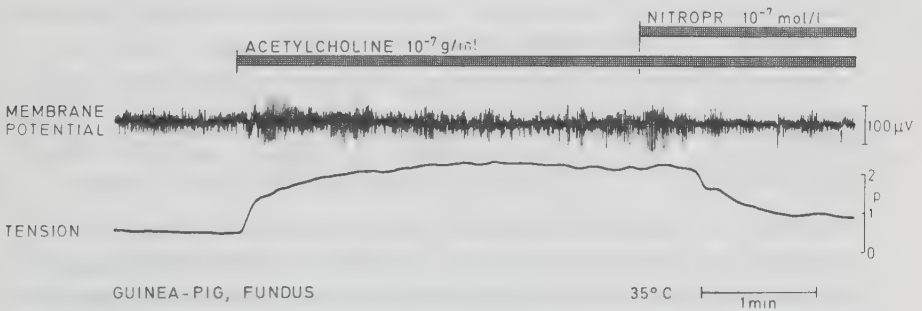


Abb. 28: Elektrische und mechanische Aktivität eines Funduspräparates (extrazelluläre Potentialableitung mit Hilfe der "Kapillare"). Wirkung von Na-Nitroprussid auf die Acetylcholin-induzierte Aktivierung

3.2.6. Bestimmung des maximalen basalen Membranpotentials von Zellen zirkulärer Antrumstreifen des Meerschweinchenmagens

Zur Absolutbestimmung des Membranpotentials glatter Muskelzellen

wurde das Membranpotential intrazellulär mit Hilfe von Glasmikroelektroden gegen eine indifferente Elektrode im Organbad abgeleitet. Mit Hilfe der Saccharose-Trennwand-Methode (Stämpfli 1954 und 1963, Berger 1963, Blaustein und Goldman 1966, Jirounek und Straub 1971) ist bislang zwar sehr gut der qualitative Verlauf des Membranpotentials glatter Muskelzellen ermittelt worden, jedoch zu Absolutbestimmungen des Membranpotentials ist diese Methode technisch noch nicht ausgereift.

Die hier zur Messung des Membranpotentials benutzten Glasmikroelektroden hatten Spitzendurchmesser von einigen zehntel μm und selbst bei einer Füllung mit 3M KCl elektrische Widerstände zwischen 30 und 150 MOhm. An den Spitzen solch hochohmiger Elektroden tritt ein meist negatives Potential ("tip potential") auf, das bis zu -100 mV betragen kann. Das Spitzenpotential, dessen Entstehung nicht restlos geklärt ist (Kern 1966, Geddes 1972) ist u.a. abhängig von der ionalen Zusammensetzung der Umgebung und von der verwendeten Glasqualität und ändert sich beim Eindringen der Elektrodenspitze in das Zellinnere. Dies kann zu systematischen Fehlbestimmungen des Membranpotentials führen, wenn man den Potentialsprung bei der Penetration als Maß für das Membranpotential benutzt; der Fehler beträgt in normaler Nährlösung etwa 30 bis 50 % des Spitzenpotentials (Adrian 1956).

Wenn das Spitzenpotential nicht vernachlässigbar klein ist (höchstens einige mV), kann sein Einfluß auf die Bestimmung des Membranpotentials berücksichtigt werden, indem man das Spitzenpotential mit dem gemessenen scheinbaren Membranpotential korreliert und auf das Spitzenpotential Null extrapoliert (Adrian 1956, Küchler et al. 1964, Riemer et al. 1974b).

Bei den hier untersuchten Zellen zirkulärer Antrumstreifen gibt es kein Ruhemembranpotential im engeren Sinne. Das basale Membranpotential zeigt sinusoidale Schwankungen, deren Tiefpunkt wir als maximales basales Membranpotential bezeichnen (Abb. 29). Diese Maximalwerte wurden mit dem Spitzenpotential der zur Messung benutzten Mikroelektroden korreliert. Durch unterschied-

liche Präparation der Mikroelektroden wurden Elektroden mit Spitzenpotentialen zwischen 0 und -79 mV für die Untersuchungen herangezogen (vergl. Anhang).

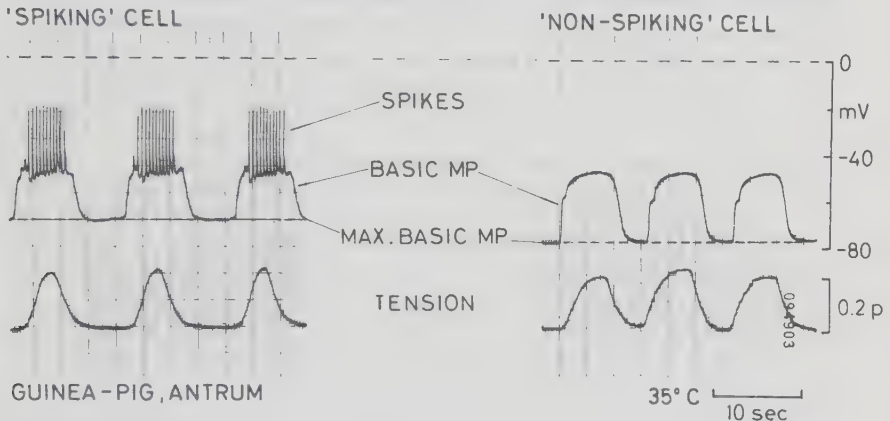


Abb. 29: Beispiele von Antrumzellen mit (links) und ohne (rechts) Spike-Entladungen. Jeweils unten sind simultan registrierte phasische Spontankontraktionen abgebildet

In Abb. 30 und Abb. 31 wurden die Meßergebnisse getrennt nach den mehr oberflächlich liegenden Zellen mit spontanen Spike-Entladungen und solchen aus meist tiefer liegenden Spike-freien Zellen ausgewertet. Aufgetragen wurde jeweils das scheinbare Membranpotential, d.h. die Potentialdifferenz zwischen dem Wert vor der Penetration und dem bei stationärem Zustand nach der Penetration, über dem Spitzenpotential der Elektroden. Das Spitzenpotential wurde nach der Penetration durch Abbrechen der Elektrodenspitze bestimmt.

Die Regressionsgeraden wurden rechnerisch bestimmt. Ihre Steigungen sind hochsignifikant ungleich Null ($P < 0,001$) und lie-

gen im Bereich der Werte, die Adrian 1956 und Küchler et al. 1964 am Froschsartorius und Riemer et al. 1974b an der *Taenia coli* des Meerschweinchens gemessen haben. Der durch das Spitzenpotential bedingte Meßfehler des Membranpotentials (die Steigung der Regressionsgeraden) beträgt demnach bei spikenden Zellen 30 % und bei Spike-freien Zellen 38 % des Spitzenpotentials.

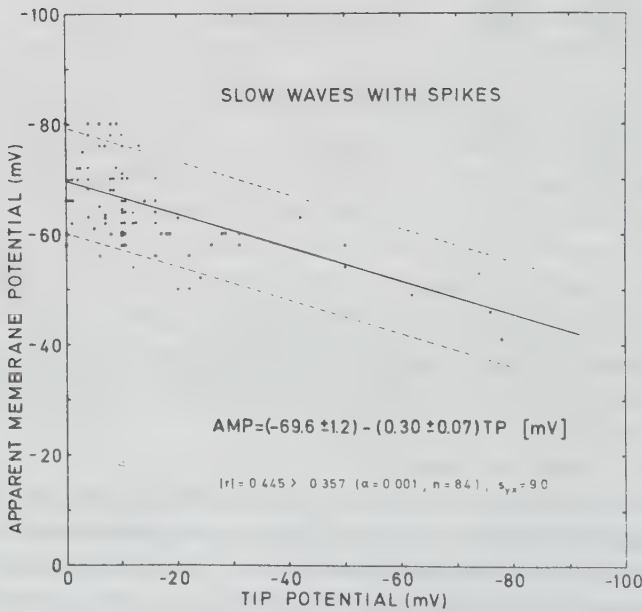


Abb. 30: Scheinbares Membranpotential in Abhängigkeit vom Spitzenpotential der Mikroelektroden mit rechnerisch bestimmter Regressionsgeraden für Zellen mit spontanen Spike-Entladungen (Formelzeichen vergl. Abschnitt 2.6.)

Das maximale basale Membranpotential ergab sich bei den vorliegenden Versuchsergebnissen zu $-69,6 \pm 1,2$ mV bei spikenden Zellen (Abb. 30) und $-78,1 \pm 0,9$ mV bei Spike-freien Zellen (Abb. 31) jeweils bezogen auf das Spitzenpotential Null. Der Unterschied von rund 9 mV ist hochsignifikant ($P < 0,0001$).

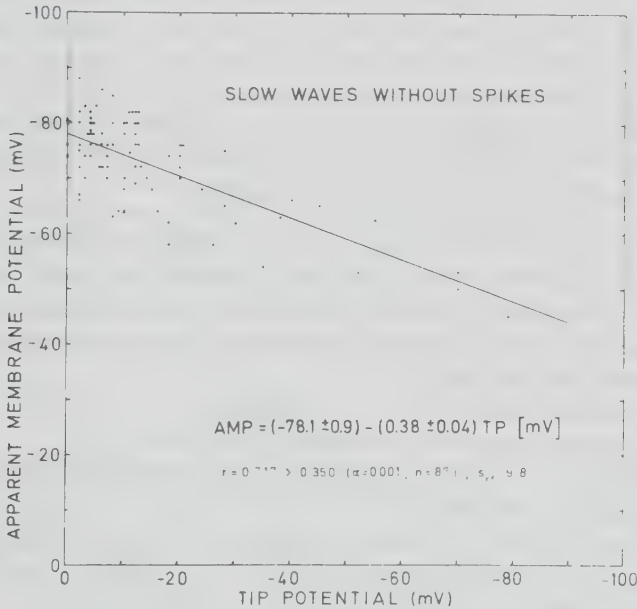


Abb. 31: Scheinbares Membranpotential in Abhängigkeit vom Spitzenpotential der Mikroelektroden mit rechnerisch bestimmter Regressionsgeraden für Zellen ohne spontane Spike-Entladungen (Formelzeichen vergl. Abschnitt 2.6.)

4. Diskussion

4.1. Wirkungen von Na-Nitroprussid und D600 auf die spontane und Acetylcholin-induzierte Aktivität der Magenmuskulatur des Meerschweinchens

Durch die vorliegenden Ergebnisse ist die Existenz zweier chemisch differenzierbarer Calcium-Aktivierungssysteme (P- und T-System) bei der glatten Magenmuskulatur des Meerschweinchens erhärtet worden (Boev et al. 1973 und 1976). Die Differenzierung durch voneinander unabhängige selektive Blockade mit unterschiedlichen Substanzen schließt einen zufälligen Effekt einer Substanz aus. Zunächst soll versucht werden, durch die Diskussion der Organbadversuche Aufschlüsse über die Differenzierung der Calciumaktivierung am Magen zu erhalten.

Es ist derzeit unbestritten, daß die Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration im Myoplasma notwendige Voraussetzung zur Aktivierung der kontraktilen Proteine der glatten Muskelzelle ist. Die Erhöhung der intrazellulären Konzentration an freiem Calcium ist grundsätzlich durch

- a.) Calciuminflux durch die Zellmembran
- b.) Freisetzung membrangebundenen Calciums
- c.) Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Strukturen möglich (Bohr 1973).

Nach dem in Abb. 2 dargestellten Modell der P- und T-Aktivierung stehen die beiden Systeme direkt in Zusammenhang mit der Bereitstellung von Aktivatorcalcium in der Zelle.

Am Magen ist das P-System mit phasischen Kontraktionen verbunden und wird durch D600 und Nifedipin gehemmt. Das T-System führt zu einer tonischen Aktivierung, die durch NP gehemmt werden kann. Calciumentzug wirkt auf die mechanische Aktivität von Muskelstreifen, die überwiegend durch das P- oder T-System aktiviert werden, ähnlich wie die entsprechenden Wirkstoffe am P- oder T-System (vergl. auch Abb. 21). Die Wirkung dieser Substanzen kann aufgrund von Untersuchungen anderer Autoren z.T. durch die

Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration kompensiert werden (Fleckenstein et al. 1971, Kreye et al. 1973, Riemer et al. 1974a, Golenhofen und Wegner 1975); unter bestimmten Bedingungen führt NP zu einer kompetitiven Hemmung der Kontraktion von Aortenpräparaten, die durch die Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration ausgelöst werden kann; NP kann ebenso wie Verapamil die durch eine K^+ -Depolarisation bewirkte Mehraufnahme von ^{45}Ca hemmen (Kreye 1974, Kreye et al. 1975). Solche Befunde führten dazu, daß diese Substanzen auch "Calcium-Antagonisten" genannt werden.

Allerdings ist die Wirkung der Antagonisten der P- und T-Systeme nicht einfach mit einem Calcium-Entzug gleichzusetzen, was allein im mechanischen Bild der Hemmung von Präparaten mit gleichzeitig vorhandenen P- und T-Aktivierungskomponenten deutlich wird. Darüber hinaus unterscheiden sich die Wirkungen der P- und T-Antagonisten auf die elektrische Aktivität sowohl untereinander als auch von der Wirkung von Calciumentzug. Dies weist darauf hin, daß diese nicht die gesamte Wirkung von Calciumentzug entfalten können, sondern in unterschiedliche Teilschritte der Calciumaktivierung eingreifen.

Um die Angriffspunkte von D600 und NP weiter einzugrenzen, soll zunächst der Einfluß dieser Substanzen auf den zeitlichen Verlauf der Aktivierung analysiert werden. Sowohl die Aktivierung des P-Systems als auch die des T-Systems vollzieht sich in zwei Phasen, wobei in beiden Fällen die schnellere Initialphase etwa 2/3 der Gesamtaktivierung beträgt (Abb. 10; Tab. 1; vergl. auch Golenhofen und Hermstein 1975). Dies könnte bedeuten, daß die Kinetik der intrazellulären Bereitstellung von Aktivatorcalcium für beide Aktivierungssysteme einheitlich abläuft. Diese Vermutung wird weiterhin dadurch gestützt, daß beide Antagonisten vergleichbar stark ihre Hemmwirkung auf die beiden Phasen der Aktivierung ausüben: D600 und NP hemmen die zweite Phase stärker als die erste. Möglicherweise liegen die Mechanismen, welche die Zweiphasen-Kinetik der Kontraktion bewirken, in Reihe mit den P- und

T-Aktivierungssystemen und werden somit in vergleichbarer Weise von der Hemmung eines der beiden Systeme betroffen.

Andere Autoren haben aus ihren Befunden geschlossen, daß die schnelle Initialphase der Kontraktion durch die Aktivierung intrazellulären oder membrangebundenen Calciums bewirkt wird (van Breemen et al. 1972, Bohr 1973, Kreye 1974). Die langsamere zweite Phase der Aktivierung wird als Folge des Influxes extrazellulären Calciums beschrieben (Steinsland et al. 1973, van Breemen et al. 1973).

Interpretiert man die Zwei-Phasen-Aktivierung am Magen in dem oben beschriebenen Sinne, dann wäre zu folgern, daß an der Wirkung von NP und D600 sowohl die Hemmung der Aktivierung intrazellulären oder membrangebundenen Calciums als auch die Hemmung des Calciuminfluxes durch die Zellmembran beteiligt sind. Bezüglich des NP ist diese Aussage in Übereinstimmung mit Kreye et al. 1975.

Zür weiteren Differenzierung der Mechanismen der P- und T-Aktivierung sollen nun die elektrophysiologischen Untersuchungen herangezogen werden. Sie erlauben auch Aussagen über die elektromechanische Kopplung, die charakteristische Unterschiede in der Aktivierung der beiden Systeme aufweist.

An Muskelpräparaten, die keine oder nur vernachlässigbare tonische Aktivierungskomponenten aufweisen, wie z.B. die Taenia coli, die Portalvene oder die distale Antrumregion des Magens des Meerschweinchens, geht mit der Hemmung der mechanischen phasischen Aktivität durch Verapamil oder D600 stets die Unterdrückung der Spike-Entladungen einher. Die Spikes werden dabei durch diese Substanzen vor der völligen Unterdrückung verbreitert und in ihrer Amplitude verringert, die sekundenrhythmischen Oszillationen werden ebenfalls unterdrückt (Golenhofen und Lammel 1972, Golenhofen et al. 1973, Riemer et al. 1974a, Golenhofen und Wegner 1975). Man kann daraus schließen, daß die P-Antagonisten sowohl den Triggermechanismus als auch den eigentlichen Spike-Me-

chanismus beeinflussen und dadurch die Spike-Entladungen verhindern. Verapamil hat zwar zudem eine schwach depolarisierende Wirkung auf die Zellmembran, jedoch blieb bei dem potenteren P-Antagonisten D600 im Mittel der vorliegenden Versuche das basale Membranpotential unbeeinflusst. Beide Substanzen bewirken in ihren spezifischen Wirkungsbereichen keine Deformation der langsamen Potentialwellen.

Aufgrund dieser Befunde ist die Annahme naheliegend, daß die P-Antagonisten ihre Wirkung auf das P-System durch eine Hemmung der Spike-Entladungen ausüben. Die Anregung des P-Systems durch ACh erfolgt in Übereinstimmung damit durch die Erhöhung der Spike-Folgefrequenz.

Die Wirkung von NP auf die spontane und ACh-induzierte Aktivität ist im elektrischen Bild durch zwei Effekte gekennzeichnet:

a.) Hemmung der Spike-Entladungen

b.) Erhöhung des basalen Membranpotentials

NP bewirkt neben der Hemmung der Spike-Entladungen eine Hyperpolarisation der Zellmembran im Falle der Spontanaktivität bzw. eine Repolarisation nach Aktivierung des Muskels durch ACh. Die Form der langsamen Potentialwellen wird dabei bis etwa 10^{-6} mol/l nicht beeinflusst. Die Spike-Entladungen werden durch NP in ihrer Folgefrequenz und bei Antrum- und Corpuspräparaten in der Anzahl der Spikes pro langsame Potentialwelle gehemmt. Der Spike selbst wird dabei in seiner Ablaufsform nicht beeinflusst (Abb. 23). Die sekundenrhythmischen Oszillationen werden nicht unterdrückt. Dies sind wichtige Unterschiede zur Wirkung von Verapamil und D600.

Zunächst ist nicht zu entscheiden, wie die Änderung der elektrischen Membranereignisse unter NP mit seiner Wirkung auf das T-System zusammenhängen. Zur weiteren Analyse kann der in Abb. 27 dargestellte Versuch herangezogen werden. Hier wird deutlich, daß die Hemmwirkung von NP auf die Kontraktion von Funduspräparaten, die vorwiegend durch das T-System aktiviert werden, nicht an die

Unterdrückung der Spike-Entladungen gebunden ist: Bei dem im unteren Teil der Abb. 27 wiedergegebenen Versuch wurden die Spike-Entladungen bei partieller Hemmung der Kontraktion durch D600 unterdrückt. Die verbleibende Spike-freie tonische Aktivierung wurde durch NP völlig unterdrückt, wobei im Mittel von 4 Versuchen das Membranpotential um etwa 8 mV anstieg.

Bei der Hemmung der Spike-Entladungen durch NP wird die Ablaufsform der Spikes nicht beeinflusst, und sekundenrhythmische Oszillationen konnten auch dann noch registriert werden, wenn während der Initialreaktion des NP keine Spikes gemessen wurden (Abb. 23). Allerdings läßt sich nicht entscheiden, ob die Amplitude oder die Ablaufsform der sekundenrhythmischen Oszillationen durch NP beeinflusst werden, da solche Oszillationen bislang nicht getrennt von den Spikes darstellbar waren.

Entsprechend den in den Abb. 16 und 17 dargestellten Versuchen scheint es zunächst naheliegend zu sein, daß NP die Spike-Entladungen durch seine hyperpolarisierende Wirkung hemmt. Eine solche Vorstellung setzt einen kritischen Schwellenwert des Membranpotentials voraus, unterhalb dessen keine Spikes ausgelöst werden können. Gegen diesen Mechanismus sprechen Versuche, bei denen bei derselben Penetration unter gleichen Bedingungen bei hohem Membranpotential Spikes registriert wurden und bei spontan stärkerer Depolarisation die Spikes ausblieben (z.B. Abb. 23 und 27). Dies kann jedoch nicht als schlüssiger Gegenbeweis gelten, da der hypothetische Schwellenwert des Membranpotentials für Spike-Entladungen ebenfalls spontanen Fluktuationen unterworfen sein kann. Versuche, bei denen bei nicht meßbaren Verschiebungen der Gipfelhöhe der langsamen Potentialwellen Spikes durch NP unterdrückt und durch ACh wieder induziert werden konnten, könnten durch eine Verschiebung des Schwellenwertes durch diese Substanzen erklärt werden.

Bei der Interpretation intrazellulärer Potentialableitungen ist darüber hinaus zu beachten, daß dabei lediglich das Membranpotential einer einzelnen Zelle abgeleitet wird, die Bestandteil

eines ganzen Zellverbandes ist, der von der Erregungswelle erfaßt wird. Bei solchen Einzelmessungen ist es nicht zu entscheiden, ob die penetrierte Zelle zu einer Schrittmacherregion der Spontanaktivität gehört oder ob die Membranereignisse durch die Erregungsübertragung über interzelluläre Nexus ausgelöst wurden. So ist es denkbar, daß durch eine erregte Nachbarzelle auch in der penetrierten Zelle Spikes ausgelöst werden können, obwohl deren eigentlicher Schwellenwert gerade nicht überschritten wurde.

Erst durch die Erhöhung der Konzentration von NP über 10^{-6} mol/l werden mit der mechanischen auch alle Komponenten der elektrischen Aktivität stark alteriert. Damit wurde angezeigt, daß der spezifische Konzentrationsbereich am Magen überschritten wurde.

Ein weiterer wichtiger Unterschied in der Wirkung von NP und D600 auf die Spike-Entladungen ist hervorzuheben: Durch D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) werden die Spike-Entladungen völlig blockiert und sind auch durch die Zugabe von ACh nicht wieder induzierbar (Abb. 19). Demgegenüber ist unter der Wirkung von NP, das zunächst ebenfalls die Spike-Entladungen völlig unterdrücken kann, die Generierung von Spikes durch ACh wieder möglich (Abb. 17, 18). Auch diese Befunde sind ein Hinweis darauf, daß NP nicht den eigentlichen Spike-Mechanismus blockiert, sondern seine Wirkung auf den Generatorprozeß, möglicherweise durch Beeinflussung eines Schwellenwertes für die Auslösung der Spikes, entfaltet. Diese Wirkung kann offensichtlich durch ACh, das anregend auf den Generatorprozeß wirkt, antagonisiert werden.

Es läßt sich anhand der bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse nicht sicher entscheiden, ob und wie die Hemmung des NP auf den Spike-Generatorprozeß mit der Hemmung des T-Systems verknüpft ist. Es ist jedoch bei Berücksichtigung aller Befunde als wahrscheinlich anzusehen, daß es sich hier um zwei qualitativ unterschiedliche Wirkungen handelt.

Bei den Bedingungen, unter denen die hier vorliegenden Versuche

durchgeführt wurden, war die Aktivierung des T-Systems durch ACh stets mit einer Depolarisation der Zellmembran verbunden, deren Höhe gut mit der tonischen Reaktion korrelierte (Boev et al. 1976). Entsprechend wurde bei der Hemmung des T-Systems durch NP die Zelle re- bzw. hyperpolarisiert.

Gegen die These, daß die Veränderung des basalen Membranpotentials ursächlich die tonische Reaktion beeinflusst, spricht allerdings, daß z.B. die langsamen Potentialwellen von Antrumpräparaten, deren Amplituden meist größer als eine ACh-induzierte Depolarisation sind, keine vergleichbare Aktivierung auslösen. Außerdem konnten durch ACh tonische Reaktionen bei K^+ -depolarisierten Funduspräparaten induziert werden, die fast die Höhe der Kontrollaktivierungen erreichten und ebenfalls durch NP gehemmt werden konnten (Boev et al. 1976). Auch an weiteren Muskeln konnten Aktivierungen unter K^+ -Depolarisation nachgewiesen werden (Axelsson 1970). Ähnliche Versuche waren Anlaß zur Formulierung einer pharmakomechanischen Kopplung bei der Aktivierung von Gefäßmuskulatur (Somlyo und Somlyo 1968, Somlyo 1975).

Durch die bisherigen Versuche kann die Rolle der hier registrierten Veränderungen des Membranpotentials bei der Aktivierung oder Hemmung des T-Systems nicht endgültig geklärt werden. Möglicherweise handelt es sich um Begleiterscheinungen der T-Aktivierung, die nicht ursächlich das T-System beeinflussen. Zumindest ist es fragwürdig, solche Aktivierungen als "nonelectrical activation" (Bohr und Uchida 1969, Bohr 1973) zu bezeichnen, worauf bereits Boev et al. 1976 hingewiesen hatten.

Die Reduzierung phasischer Kontraktionen durch NP, die bei Antrumpräparaten mit einer Hemmung der Spike-Entladungen verknüpft ist, kann als unspezifische Wirkung des NP erklärt werden, die nicht mit der Hemmung des T-Systems in Zusammenhang steht.

Andererseits hemmen P-Antagonisten auch die Aktivierung von Funduspräparaten, die normalerweise überwiegend tonisch mit geringen Überlagerungen phasischer Kontraktionen verläuft und die

im elektrischen Bild oft mit Spike-Entladungen verbunden ist. Hier führt D600 zu einer partiellen Hemmung der Gesamtreaktion bei gleichzeitiger Unterdrückung der Spikes (Abb. 27). Die verbleibende Kontraktion kann durch NP nahezu vollständig unterdrückt werden. Dagegen bleibt ohne die Anwendung von D600 im Versuch der Abb. 28 eine Restaktivierung unter der Wirkung von NP erhalten, und auch die Spike-Entladungen werden nicht vollständig unterdrückt. Diese Befunde lassen vermuten, daß die Kontraktion von Funduspräparaten eine durch das P-System gesteuerte Komponente enthält. Der quantitative Anteil dieser Komponente ist jedoch nicht sicher zu bestimmen. Er läßt sich bei alleiniger Applikation von NP nach der ACh-Aktivierung nicht abmessen, da dieser T-Antagonist nach bisherigem Wissen auch eine Hemmung des P-Systems bewirkt. Auch die Hemmung der ACh-induzierten Aktivität durch D600 allein ist zur Bestimmung der P-Komponente des Fundus nicht heranzuziehen, da dieser P-Antagonist ebenfalls eine geringe Hemmung des T-Systems bewirken kann. Darauf deutet hin, daß Nifedipin bei gleicher Hemmung der Antrumaktivität wie D600 die Kontraktion von Funduspräparaten weniger stark zu hemmen scheint als D600 (Abb. 11). Andererseits ist es nicht auszuschließen, daß auch Nifedipin eine gewisse Hemmung des T-Systems bewirken kann.

Geht man zunächst davon aus, daß Nifedipin ausschließlich auf das P-System einwirkt, dann läßt sich eine Abschätzung des Anteils der P-Aktivierung an der Kontraktion von Funduspräparaten vornehmen. In einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-7}$ mol/l hemmt es 90 % der Kontraktionen von Antrumpräparaten und 30 % der Fundusaktivierung (Abb. 11). Demzufolge wäre etwa 1/3 der Kontraktion von Funduspräparaten auf eine Aktivierung des P-Systems zurückzuführen.

Zur Klärung der im Zusammenhang mit der Selektivität der Wirkung der verschiedenen Antagonisten des P- und T-Systems am Magen noch offenen Fragen können weitere elektrophysiologische Untersuchungen ebenso dienen wie die Erstellung von genaueren Dosis-

Wirkungsbeziehungen. Zur weiteren Analyse der beiden Aktivierungssysteme bietet sich das Nifedipin an, dessen Selektivität die des D600 zu übertreffen scheint. Andere und möglicherweise im Vergleich zum NP selektivere Antagonisten des T-Systems am Magen sind bisher noch nicht bekannt geworden.

4.2. Messungen des maximalen basalen Membranpotentials

Wegen der geringen Abmessungen von glatten Muskelzellen ist die Ableitung ihres Membranpotentials mit Glasmikroelektroden äußerst diffizil. Einen Überblick über frühere Meßmethoden und die damit erzielten Ergebnisse gaben Burnstock et al. 1963.

Die meisten Messungen des Membranpotentials spontanaktiver Muskelzellen liegen bei Werten zwischen -40 und -60 mV und reichen bei Zellen, die normalerweise nicht spontanaktiv sind, bis -70 mV. Neuere Messungen des Membranpotentials glatter Muskelzellen erreichen überwiegend einen Wert um -60 mV (Kuriyama et al. 1970: Meerschweinchenmagen -57 - -61 mV; Golenhofen et al. 1970: Magenantrum des Meerschweinchens bis -70 mV; Haeusler 1972: Kaninchen-Pulmonararterie -58 mV; Hendrickx und Casteels 1974: Kaninchen-Ohrarterie -58 mV; Osa 1974: Mäuse-Uterus -55 mV; Riemer et al. 1974: Meerschweinchen-Taenia coli -51 mV; Creed et al. 1975: Ratten-anococcygeus -61,5 mV; Ito und Kuriyama 1975: Meerschweinchenmagen -54 - -63 mV).

Gegenüber den meisten der hier zitierten Werte liegen die in dieser Arbeit vorgelegten Messungen des maximalen basalen Membranpotentials mit -69,6 mV für Spike-generierende Zellen und -78,1 mV für Zellen ohne spontane Spike-Entladungen deutlich höher.

Bei der Erklärung dieser Differenz zu der Mehrzahl der bislang veröffentlichten Werte können folgende Fehlerquellen eine Rolle spielen:

a.) starke Dehnung der Präparate zur Ruhigstellung des Gewebes

b.) Schaffung eines Leck-Widerstandes in der Zellwand bei der Penetration

c.) Vernachlässigung des Spitzenpotentials der Mikroelektroden
Alle diese Möglichkeiten bewirken eine systematisch zu niedrige Bestimmung des Membranpotentials. Systematische Fehler, die bei den hier angewendeten Meßbedingungen zu einer Hyperpolarisation der Membran führen können, sind bisher nicht bekannt.

Aufgrund der vorliegenden Messungen ist es sicher unzutreffend, daß der glatte Muskel allgemein durch ein niedriges Membranpotential ausgezeichnet sei (Hasselbach 1971). Andererseits bedarf es weiterer sorgfältiger Untersuchungen darüber, ob die hier vorgestellten Ergebnisse auf andere glattmuskuläre Strukturen übertragen werden können.

Unsere Messungen des Membranpotentials sind nach Zellen mit und solchen ohne spontane Spike-Entladungen differenziert worden. Es bedarf noch der Klärung, ob die beiden Aktivitätsmuster mit morphologischen Unterschieden zweier Zelltypen korrelieren, wie sie von Devine et al. 1973 beschrieben wurden. Auch Kuriyama et al. 1975 haben aus unterschiedlichen mechanischen und elektrischen Reizantworten von zirkulären und longitudinalen Muskelfasern des Meerschweinchenmagens auf verschiedene Mechanismen der Calciumfreisetzung in der Zelle geschlossen.

1976 berichteten Kuriyama et al., daß Spikes spontan lediglich in zirkulären Muskelschichten des Antrums auftraten und in longitudinalen Fasern erst nach elektrischer oder chemischer Stimulierung registriert werden konnten; im Gegensatz zu den vorliegenden Messungen und zu Golenhofen et al. 1970 hatten Kuriyama et al. 1976 bei ihren Untersuchungen auch am Magenfundus keine spontanen Spike-Entladungen gefunden.

Andererseits haben Kuriyama et al. 1970 auch an longitudinalen Muskelschichten des Meerschweinchenmagens spontane Spike-Entladungen nachgewiesen, und auch Osa und Katase 1975 fanden bezüglich

der Spike-Entladungen keinen Unterschied zwischen longitudinalen und zirkulären Streifen der Uterusmuskulatur von Ratten.

Unsere Erfahrungen sprechen dafür, daß spontane Spike-Entladungen nur in größeren zusammenhängenden Zellverbänden nachweisbar sind; bei zu kleinen Präparaten kann keine oder nur eine verminderte Spontanaktivität registriert werden. Um aufgrund dieser Tatsache ausbleibende Spike-Entladungen erklären zu können, sollten davon die Muskelschichten betroffen sein, die quer zur Schnittführung bei der Herstellung zirkulärer Präparatestreifen verlaufen - und das wären die longitudinalen Fasern. Nun befinden sich laut Kuriyama et al. 1970 beim Meerschweinchen die longitudinalen Muskelschichten des Antrums auf der Außenseite der Magenmuskulatur. Danach müßten bei der Penetration von der Serosa-Seite her die zirkulären Fasern die tieferliegenden sein; aber gerade in diesen Schichten trafen wir normalerweise die Zellen ohne spontane Spike-Entladungen an.

Zur weitergehenden Klärung dieser Frage könnten neben morphologischen Untersuchungen die Messung des Membranpotentials an getrennten longitudinalen und zirkulären Muskelschichten dienen, die jedoch aus präparationstechnischen Gründen bei der überaus empfindlichen Reaktion des Spike-Mechanismus auf Schädigungen der Zellen nicht ohne Schwierigkeiten durchzuführen sein werden.

5. Zusammenfassung

Durch die Auswertung von Mechanogrammen sowie durch elektro-physiologische Untersuchungen mit intra- und extrazellulären Methoden der Potentialableitung wurden die Mechanismen der spontanen sowie der ACh-induzierten Aktivität zirkulärer Muskelstreifen des Meerschweinchenmagens analysiert. Die Ergebnisse haben die Existenz zweier Aktivierungssysteme (P- und T-System) in der Magenmuskulatur erhärtet.

D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) und NP (10^{-6} mol/l) hemmen die Spontanaktivität von Muskelpräparaten aller Magenregionen. Unter der Wirkung von D600 werden die Spike-Entladungen unterdrückt. NP führt zu einer Erhöhung des maximalen basalen Membranpotentials und hemmt ebenfalls die Spike-Entladungen. Im Gegensatz zu D600 lassen sich unter der Wirkung von NP die unterdrückten Spike-Entladungen durch ACh wieder induzieren, wobei die Zellmembran um einige mV depolarisiert wird.

Die Aktivierung der Muskelpräparate durch ACh (10^{-7} g/ml) verläuft in zwei Phasen. Einer schnellen Initialkontraktion folgt eine zweite langsamere Phase. D600 und NP hemmen beide Phasen, wobei die zweite Phase stärker als die erste beeinflusst wird.

D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) hemmt die ACh-induzierte (10^{-7} g/ml) Maximalkontraktion bei Antrumpräparaten um 83 %, bei Funduspräparaten um 47 %. Unter dem Einfluß von NP (10^{-6} mol/l) werden Antrumpräparate um 33 % und Funduspräparate um 61 % gehemmt. Der Unterschied der Hemmwirkung beider Substanzen auf Präparate der gleichen Magenregion ist hochsignifikant.

Parallel zur Hemmung der ACh-induzierten mechanischen Aktivität reduziert D600 die Frequenz der Spike-Entladungen und verformt den Spike bis zur völligen Unterdrückung. NP führt zu einer Repolarisation der Zellmembran und hemmt ebenfalls die Spike-Entladungen. Da NP jedoch die Ablaufsform der Spikes nicht beeinflusst, wird vermutet, daß die Substanz nicht auf den Spike-Mechanismus selbst, sondern auf den Generatorprozeß wirkt, der die

Spikes auslöst. Die Hemmwirkung des NP auf die P- und T-Aktivierungssysteme kann durch Erhöhung der ACh-Konzentration teilweise kompensiert werden.

Die Wirkung von NP auf die phasisch-peristaltische Aktivität sowie die Spike-Entladungen zeigt deutliche Adaptationserscheinungen, wodurch initiale Hemmeffekte im elektrischen und mechanischen Bild im Verlauf weniger Minuten teilweise zurückgehen. Es wird vermutet, daß die Hemmwirkung von NP auf die phasische Aktivität von Antrumpräparaten eine unspezifische Nebenwirkung darstellt. Hingegen läßt die Hemmwirkung des D600 bei Funduspräparaten auf eine an das P-System gebundene Aktivierungskomponente in diesem Bereich des Magens schließen.

Diazoxid (10^{-4} g/ml) hemmt Antrum- sowie Fundusstreifen um 20 - 30 %. Nifedipin ist ein wirksamer P-Antagonist am Magen, der bei einer Konzentration von $4 \cdot 10^{-7}$ mol/l eine dem D600 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) vergleichbare Wirkung entfaltet.

Am isolierten ganzen Magen bewirken D600 und NP eine Erniedrigung des ACh-induzierten Innendruckes. Die Wirkung von NP ist durch die Erhöhung der ACh-Konzentration in höherem Maße kompensierbar als die von D600.

In zirkulären Muskelstreifen der Antrumregion lassen sich aufgrund des spontanen elektrischen Aktivitätsmusters zwei Zelltypen unterscheiden. Ein Typ ist meist in oberflächlichen Zellschichten zu finden und zeigt spontane Spike-Entladungen, die langsamen Schwankungen des basalen Membranpotentials überlagert sind. Das maximale basale Membranpotential dieser Zellen beträgt $69,6 \pm 1,2$ mV. Ein zweiter Zelltyp ist in tieferliegenden Zellschichten anzutreffen und zeigt normalerweise keine spontanen Spike-Entladungen. Sein maximales basales Membranpotential ist hochsignifikant höher als das der Zellen mit spontanen Spike-Entladungen und beträgt $78,1 \pm 0,9$ mV.

ANHANG:

Untersuchungen von Glasmikroelektroden mit unterschiedlichen Spitzenpotentialen

Das Spitzenpotential von Glasmikroelektroden kann zu systematischen Fehlern bei der Absolutbestimmung des Membranpotentials führen. Es wurde bereits in Abschnitt 3.2.6. hervorgehoben, daß der Meßfehler für das Membranpotentials umso größer ist, je höher das Spitzenpotential der Elektroden ist. Wünschenswert sind daher Mikroelektroden mit Spitzenpotentialen möglichst nahe Null, um so direkt eine Aussage über das absolute Membranpotential aus der Messung des Potentialsprunges bei der Penetration der Elektrode in das Zellinnere machen zu können.

Zu theoretischen Problemen und zu verschiedenen Methoden, das Spitzenpotential von Glasmikroelektroden zu beeinflussen, finden sich bei Geddes 1972 und Kern 1966 eine Reihe von Hinweisen. Zwei einfache Methoden, das Spitzenpotential zu verringern, sind

- a.) die Verwendung eines Millipor- Filters zur physikalischen Reinigung der Elektrolytlösung (Lassen und Sten-Knudsen 1968, Casteels et al. 1971) und
- b.) das Ansäuern der Elektrodenfüllung (Williams et al. 1971, Wann und Goldsmith 1972, Riemer et al. 1974b, Okada und Inouye 1975).

Beide dieser Methoden wurden geprüft, indem das Membranpotential zirkulärer Muskelstreifen gemessen wurde.

Das zur Herstellung der Elektroden verwendete Ziehgerät lieferte mit jedem Ziehvorgang ein symmetrisches Mikroelektrodenpaar.

Für die Untersuchungen wurde ein Teil der Elektroden mit 3M KCl gefüllt, die zuvor durch ein Membranfilter mit einer Porenweite von 0,1 μm gesaugt worden war. Ein anderer Teil wurde mit zusätzlich auf pH 2 angesäuerter Lösung gefüllt; zum Ansäuern wurde HCl benutzt. Tabelle 4 gibt die arithmetischen Mittelwerte der Spitzenpotentiale der verschiedenen Gruppen mit dem dazuge-

hörigen Schwankungsbereich im Vergleich zu den Werten von Elektroden mit ungefiltertem und ungesäuertem Füllmedium wieder.

Elektrodenfüllung	n	mittl. Spitzenpot. (mV)	Schwank.-Bereich d. Spitzenpot. (mV)
gefiltert und angesäuert (pH 2)	33	-4 ± 1	0 bis -18
gefiltert	64	-6 ± 1	0 bis -24
ungefiltert und nicht gesäuert	31	-25 ± 7	-9 bis -79

Tab.4: Zusammenstellung der Spitzenpotentiale von Glasmikroelektroden mit unterschiedlich präparierter Elektrolytfüllung (siehe Text); n = Anzahl der ausgewerteten Elektroden

Die untersuchten Glaskapillaren wurden weder vor noch nach dem Ziehvorgang besonderen Reinigungsverfahren unterzogen, wie sie von anderen Autoren vorgeschlagen werden (Geddes 1972, Tasaki et al. 1954, Wann und Goldsmith 1972, Okada und Inouye 1975). Dies muß beim Vergleich der hier angegebenen Werte für die Spitzenpotentiale mit denen anderer Autoren gegebenenfalls berücksichtigt werden. Darüber hinaus ist der Spitzendurchmesser selbst und die zur Herstellung der Elektroden verwendete Glasart (Kurella 1969, Wann und Goldsmith 1972) von Einfluß auf das Spitzenpotential.

Als Kriterium für die Güte der Elektroden wurde die Chance benutzt, eine erfolgreiche Penetration ausführen zu können. Als erfolgreich wurde eine Penetration dann bezeichnet, wenn sich rasch nach dem Einstich die normale elektrische Spontanaktivität einstellte. Ein Beispiel solch einer Penetration zeigt Abb. 32, wo die elektrische Aktivität von Antrummuskulatur dargestellt ist. Innerhalb einer Minute stellte sich die normale Spontanaktivität ein. Der Idealfall, daß sich unmittelbar nach dem Einstich die

Normalaktivität einstellte, war relativ selten; eine Einstichreaktion bis zu einer Minute, während der sowohl das basale Membranpotential als auch die Spike-Amplitude reduziert sind, kann noch als normal toleriert werden.



Abb. 32: Beispiel einer Einstichreaktion in eine Zelle eines Antrumpräparates mit spontanen Spike-Entladungen

Für den weiteren Vergleich von angesäuerten und nicht gesäuerten Elektroden wurde je eine von paarweise symmetrisch hergestellten Elektroden mit gefilterter 3M KCl und die andere mit zusätzlich auf pH 2 angesäuerter Lösung gefüllt. Da die Elektroden eines Paares nach gleicher Füll- und Lagerzeit getestet wurden, konnte so der Einfluß anderer Faktoren weitgehend eliminiert werden. Bei 46 Elektrodenpaaren führten nur 14 angesäuerte Elektroden zu einer erfolgreichen Penetration, während 31 nicht gesäuerte nach diesem Kriterium brauchbar waren. In 12 Fällen waren beide Elektroden eines Paares brauchbar, in 19 Fällen nur der nicht gesäuerte und in 2 Fällen nur der gesäuerte Partner.

Nach diesen Erfahrungen beeinträchtigt die Säuerung die Elektrodengüte. Möglicherweise verändert die Salzsäure die mechanischen Eigenschaften der Elektrodenspitzen, deren Glaswände Eigenschaften dünner Membranen haben (Agin und Holtzman 1966, Agin 1969)

oder die mit Glas-pH-Elektroden verglichen werden können (Lavallée und Szabo 1969, zitiert nach Geddes 1972). Auf die gesteigerte mechanische Empfindlichkeit von angesäuerten Elektroden weist die Erfahrung hin, daß diese öfter als ihre nicht gesäuerten Partner bei der ersten Berührung der Präparateoberfläche abbrechen und damit zumeist für den weiteren Gebrauch ausschieden.

Als wenig aufwendiges Verfahren zur Verringerung der Spitzenpotentiale von Glasmikroelektroden ist aufgrund der vorliegenden Untersuchungen das Filtern der Elektrolytlösung gegenüber einer zusätzlichen Ansäuerung vorzuziehen.

LITERATURVERZEICHNIS

- ADRIAN, R.H.: The effect of internal and external potassium concentration of the membrane potential of frog muscle
J.Physiol. 133, 631-658 (1956)
- AGIN, D.: Electrochemical properties of glass microelectrodes
In: Glass Microelectrodes, ed. by M. Lavallée, O.F. Schanne, N.C. Herbert, 62-75, 446 pp., John Wiley & Sons, New York (1969)
- AGIN, D., HOLTZMAN, D.: Glass microelectrodes: origin and elimination of tip potentials
Nature 211, 1194-1195 (1966)
- AXELSSON, J.: Mechanical properties of smooth muscle, and the relationship between mechanical and electrical activity
In: Smooth muscle, ed. by E. Bülbbring, A.F. Brading, A.W. Jones, T. Tomita, 282-315, Edward Arnold (Publishers) London (1970)
- BERGER, W.: Die Doppelsaccharosetrennwandtechnik: Eine Methode zur Untersuchung des Membranpotentials und der Membraneigenschaften glatter Muskelzellen
Pflügers Arch.ges.Physiol. 277, 570-576 (1963)
- BERGER, W., BARR, L.: Use of rubber membranes to improve sucrose-gap and other electrical recording techniques
J.appl.Physiol. 26, 378-382 (1969)
- BILEK, J., LAVEN, R., PEIPER, U., REGNAT, K.: The effect of verapamil on the response to noradrenaline or to potassium-depolarization in isolated vascular strips
Microvasc.Res. 7, 181-189 (1974)
- BLAUSTEIN, M.P., GOLDMAN, D.E.: Origin of axon membrane hyperpolarization under sucrose-gap
Biophys.J. 6, 453-470 (1966)

- BOEV, K., GOLENHOFEN, K.: Sucrose-gap technique with pressed-rubber membranes
Pflügers Arch. 349, 277-283 (1974)
- BOEV, K., GOLENHOFEN, K., LUKANOW, J.: Selective suppression of phasic and tonic activation mechanisms in stomach smooth muscle
Pflügers Arch. 343, R56 (1973)
- BOEV, K., GOLENHOFEN, K., LUKANOW, J.: Selective suppression of phasic and tonic activation mechanisms in stomach smooth muscle
In: Smooth muscle Physiology, ed. by E. Bülbring, M.F. Shuba, 203-208, Raven Press, New York (1976)
- BOHR, D.F.: Electrolytes and smooth muscle contraction
Pharmacol. Rev. 16, 85-111 (1964)
- BOHR, D.F.: Vascular smooth muscle updated
Circulat. Res. 32, 665-672 (1973)
- BOHR, D.F., UCHIDA, E.: Activation of vascular smooth muscle
In: The pulmonary circulation and interstitial space, 133-143, University of Chicago Press, Chicago III (1969)
- BOLTON, T.B.: The depolarizing action of acetylcholine or carbachol in intestinal smooth muscle
J.Physiol. 220, 647-671 (1972)
- BOLTON, T.B.: The permeability change produced by acetylcholine in smooth muscle
In: Drug receptors, ed. by H.P. Lang, Macmillan, London (1973)
- BOLTON, T.B.: Effects of stimulating the acetylcholine receptor on the current-voltage relationship of the smooth muscle membrane studied by voltage clamp of potential recorded by micro-electrode
J.Physiol. 250, 175-202 (1975)

- BRECHT, K., GEBERT, G., NGUYEN-DUONG, H.: Über Wirkungen von elektrischen, ionalen, hormonalen und pharmakologischen Reizen auf die Mechanik von Arterien und Venen und ihre Beeinflussung durch Nifedipin (Adalat^R)
Med.Welt 26 (N.F.), 1602-1609 (1975)
- van BREEMEN, C., FARINAS, B.R., CASTEELS, R., GERBA, P., WUYTACK, F., DETH, R.: Factors controlling cytoplasmatic Ca⁺⁺ concentration
Phil.Trans.R.Soc. Lond. (Biol.) 265, 57-71 (1973)
- van BREEMEN, C., FARINAS, B.R., GERBA, P., McNAUGHTON, E.D.: Excitation-contraction coupling in rabbit aorta studied by the lanthanum method for measuring cellular calcium influx
Circulat. Res. 30, 44-54 (1972)
- BÜLBRING, E.: Membrane potentials of smooth muscle fibres of the taenia coli of the guinea-pig
J.Physiol. 125, 302-315 (1954)
- BURNSTOCK, G.: The effects of acetylcholine on membrane potential, spike frequency, conduction velocity and excitability in the taenia coli of the guinea-pig
J.Physiol. 143, 165-182 (1958)
- BURNSTOCK, G., HOLMAN, M.E., PROSSER, C.L.: Electrophysiology of smooth muscle
Physiol. Rev. 43, 482-527 (1963)
- BURNSTOCK, G., STRAUB, W.: A method for studying the effects of ions and drugs on the resting and action potentials in smooth muscle with external electrodes
J.Physiol. 140, 156-167 (1958)
- CANNON, W.B.: The movements of the stomach studied by means of the Roentgen rays
Amer.J.Physiol. 1, 359-382 (1898)

- CASTEELS, R., DROOGMANS, G., HENDRICKX, H.: Membrane potential of smooth muscle cells in K-free solution
J.Physiol. 217, 281-295 (1971)
- CODE, C., CARLSON, H.C.: Motor activity of the stomach
In: Handbook of Physiology, Section 6, Vol. IV, 1903-1916,
Amer.Physiol.Soc., Washington (1968)
- CREED, K.E., GILLESPIE, J.S., MUIR, T.C.: The electrical basis of excitation and inhibition in the rat anococcygeus muscle.
J.Physiol. 245, 33-47 (1975)
- DANIEL, E.E.: The electrical and contractile activity of the pyloric region in dog and the effect of drugs
Gastroenterology 49, 403 (1965)
- DANIEL, E.E., IRWIN, J.: Electrical activity of gastric muscle
In: Handbook of Physiology, Section 6, Vol. IV, 1969-1984,
Washington (1968)
- DAVIDSSOHN, K.: Dissertation, Königsberg (1887), zitiert nach Kreye 1974
- DELGADO, J.M.R.: Electrodes for extracellular recording and stimulation
In: Nastuk, W.L.: Physical techniques in biological research V, 88-143, Academic Press, New York - London (1964)
- DEVINE, C.E., SOMLYO, A.V., SOMLYO, A.P.: Sarcoplasmic reticulum and mitochondria as cation accumulation sites in smooth muscle
Phil.Trans.R.Soc.Lond. B 265, 17-23 (1973)
- EBASHI, S., ENDO, M.: Calcium ion and muscle contraction
Prog.Biophys.molec.Biol. 18, 123-183 (1968)
- FINNERTY, F.A., KAKAVIATOS, N., TUCKMAN, J., MAGILL, J.: Clinical evaluation of diazoxide. A new treatment for acute hypertension
Circulation 28, 203-208 (1963)

- FLECKENSTEIN, A., DÖRING, H.J., KAMMERMEIER, H.: Einfluß von Beta-Rezeptorenblockern und verwandten Substanzen auf Erregung, Kontraktion und Energiestoffwechsel der Myokardfaser
Klin.Wschr. 46, 343-351 (1968)
- FLECKENSTEIN, A., GRÜN, G., TRITTHART, A., BYON, K.: Uterus-Relaxation durch hochaktive Ca^{++} -antagonistische Hemmstoffe der elektro-mechanischen Kopplung wie Isoptin (Verapamil, Iproveratril), Substanz D600 und Segontin (Prenylamin)
Klin.Wschr. 49, 32-41 (1971)
- FLECKENSTEIN, A., KAMMERMEIER, H., DÖRING, H.J., FREUND, H.J.: Zum Wirkungsmechanismus neuartiger Koronardilatoren mit gleichzeitig Sauerstoff-einsparenden Myokardeffekten, Prenylamin und Iproveratril
Z.Kreisl.-Forsch. 56, 716-744, 839-858 (1967)
- FLECKENSTEIN, A., TRITTHART, H., DÖRING, H.J., BYON, K.Y.: Bay a 1040 - ein hochaktiver Ca^{++} -antagonistischer Inhibitor der elektro-mechanischen Kopplungsprozesse am Warmblüter - Myokard
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 22-32 (1972)
- FLECKENSTEIN, A., TRITTHART, H., FLECKENSTEIN, B., HERBST, A., GRÜN, G.: Eine neue Gruppe kompetitiver Ca^{++} -Antagonisten (Iproveratril, D600, Prenylamin) mit starken Hemmeffekten auf die elektromechanische Kopplung im Warmblüter-Myokard
Pflügers Arch. 307, R25 (1969)
- FRANK, K., BECKER, M.C.: Microelectrodes for recording and stimulation
In: Nastuk, W.L.: Physical techniques in biological research V, 22-87, Academic Press, New York - London (1964)
- GEDDES, L.A.: Electrodes and the measurement of bioelectric events
Wiley-Interscience, New York - London - Sidney - Toronto (1972) pp 154-196
- GOLLENHOFEN, K.: Slow rhythms in smooth muscle (minute rhythm)
In: Smooth Muscle, ed. by E. Bülbring, A.F. Brading, A.W. Jones, T. Tomita, 316-342, Edward Arnold (Publishers), London (1970)

- GOLENHOFEN, K.: The concept of P- and T-Mechanisms in smooth muscle activation
Pflügers Arch. 343, R57 (1973)
- GOLENHOFEN, K.: P- and T-systems for calcium activation in vascular smooth muscle
In: The smooth muscle of artery, ed. by S. Wolf, N.T. Werthesen, 46-59, Plenum Press, New York - London (1975)
- GOLENHOFEN, K.: Spontaneous activity and functional classification of mammalian smooth muscle.
In: Physiology of smooth muscle, ed. by E. Bülbring, M.F. Shuba, 91-97, Raven Press, New York (1976a)
- GOLENHOFEN, K.: Theory of P- and T-systems for calcium activation in smooth muscle
In: Physiology of smooth muscle, ed. by E. Bülbring, M.F. Shuba, 197-202, Raven Press, New York (1976b)
- GOLENHOFEN, K., HERMSTEIN, N.: Spike-free activation mechanisms in vascular smooth muscle
J.Physiol. 231, 14-15P (1973)
- GOLENHOFEN, K., HERMSTEIN, N.: Differentiation of calcium activation mechanisms in vascular smooth muscle by selective suppression with Verapamil and D600.
Blood Vessels 12, 21-37 (1975)
- GOLENHOFEN, K., HERMSTEIN, N., LAMMEL, E.: Membrane potential and contraction of vascular smooth muscle (portal vein) during application of noradrenaline and high potassium and selective inhibitory effects of iproveratril (verapamil)
Microvasc.Res. 5, 73-80 (1973)
- GOLENHOFEN, K., LAMMEL, E.: Selective suppression of some components of spontaneous activity in various types of smooth muscle by Iproveratril (Verapamil)
Pflügers Arch. 331, 233-243 (1972)

- GOLENHOFEN, K., v.LOH, D.: Elektrophysiologische Untersuchungen zur normalen Spontanaktivität der isolierten Taenia coli des Meerschweinchens
Pflügers Arch. 314, 312-328 (1970)
- GOLENHOFEN, K., v.LOH, D., MILENOV, K.: Elektrophysiologische Untersuchungen zur Spontanaktivität isolierter Muskelpräparate aus verschiedenen Abschnitten des Meerschweinchen-Magens
Pflügers Arch. 315, 336-356 (1970)
- GOLENHOFEN, K., NEUSER, G.: P- and T-mechanisms in the activation of uterine smooth muscle
Pflügers Arch. 347, R15 (1974)
- GOLENHOFEN, K., WEGNER, H.: Tonische, Spike-freie Aktivierungsmechanismen bei Magenmuskulatur des Meerschweinchens.
Pflügers Arch. 335, R53 (1972)
- GOLENHOFEN, K., WEGNER, H.: Spike-free activation mechanism in smooth muscle of guinea-pig stomach
Pflügers Arch. 354, 29-37 (1975)
- GOLENHOFEN, K., WESTON, A.H.: Differentiation of calcium activation systems in vascular smooth muscle
Abstracts of the symposium "The role of ions in the transmission of signals from tissue and blood to the vascular smooth muscle cells",Tübingen (1976)
- GRÜN, G., FLECKENSTEIN, A.: Die elektromechanische Entkopplung der glatten Gefäßmuskulatur als Grundprinzip der Coronardilatation durch 4- (2-Nitrophenyl) - 2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester (Bay a 1040, Nifedipin)
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 22, 334-343 (1972)
- HAEUSLER, G.: Differential effect of verapamil on excitation-contraction coupling in smooth muscle and on excitation-secretion coupling in adrenergic nerve terminals
J.Pharmacol.exp.Ther. 180, 672-682 (1972)

- HASSELBACH, W.: Muskel
In: Physiologie des Menschen, Bd 4, Seite 38, Hrsg.:
O.H. Gauer, K. Kramer, R. Jung, Urban und Schwarzenbeck,
München - Berlin - Wien (1971)
- HENDRICKX, H., CASTEELS, R.: Electrogenic sodium pump in arterial
smooth muscle cells
Pflügers Arch. 346, 299-306 (1974)
- HOLMAN, M.E.: Introduction to electrophysiology of visceral smooth
muscle
In: Handbook of Physiology, Section 6, Vol. IV, 1665-1708,
Amer.Physiol.Soc., Washington (1968)
- HUXLEY, A.F.: Review lecture muscular contraction
J.Physiol. 243, 1-43 (1974)
- ITO, Y., KURIYAMA, H.: Responses to field stimulation of the
smooth muscle cell membrane of the guinea-pig stomach
Jap.J.Physiol. 25, 333-344 (1975)
- JIRONEK, P., STRAUS, R.W.: The potential distribution and the
short-circuiting factor in the sucrose gap.
Biophys.J. 11, 1-10 (1971)
- JOHANSSON, S.: Electromechanical and mechano-electrical coupling
in vascular smooth muscle
Angiologica 8, 129-143 (1971)
- JOHNSON, C.C.: The actions of toxicity of sodium nitroprusside.
Arch.int.Pharmacodyn. 35, 480-496 (1929), zitiert nach Kreye
1974
- JUST, H., STEIN, U.: Untersuchungen über die Wirkung von Diazoxid,
einer neuen blutdrucksenkenden Substanz, auf den großen und
den kleinen Kreislauf beim Hypertoniker
Zschr.f.Kreislaufforschung 58, 9, 925-936 (1969)
- KERN, R.: Untersuchungen über die elektrischen Eigenschaften von
Glasmikroelektroden
Dissertation, Heidelberg (1966)

- KOSCHE, F., RAFF, K.W., LOCHNER, W.: Über die Beeinflussung der Wirkung von Coronardilatoren durch die extrazelluläre Calciumkonzentration (ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus von Coronardilatoren)
Pflügers Arch. 335, 46-57 (1972)
- KREBS, H.A., HENSELEIT, K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 210, 33-66 (1932)
- KREYE, V.A.W.: Untersuchungen zum zellulären Wirkungsmechanismus vasodilatatorischer Pharmaka unter besonderer Berücksichtigung von Natrium-Nitroprussid
Habilitationsschrift, Heidelberg (1974)
- KREYE, V.A.W., BARON, G.D., LÜTH, J.B., SCHMIDT-GAYK, H.: Mode of action of sodium nitroprusside on vascular smooth muscle
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 288, 381-402 (1975)
- KREYE, V.A.W., SCHMIDT-GAYK, H., BAUDOUIN-LEGROS, M.: Calcium Antagonism of sodium nitroprusside in vascular smooth muscle
Pflügers Arch. 339, R56 (1973)
- KÜCHLER, G., BEYER, H., HUMMEL, M., MERREM, B.: Zur Frage der Übertragungseigenschaften von Glasmikroelektroden bei der intrazellulären Membranpotentialmessung
Pflügers Arch. 280, 210-233 (1964)
- KURELLA, G.A.: The difference of electric potentials and the partition of ions between the medium and vacuola of the alga
In: Glass Microelectrodes, ed. by M. Lavallée, O.F. Schanne, N.C. Herbert, 446 pp, John Wiley & Sons, New York (1969)
- KURIYAMA, H., MISHIMA, K., SUZUKI, H.: Some differences of contractile responses of isolated longitudinal and circular muscle from the guinea-pig stomach
J.Physiol. 251, 317-331 (1975)
- KURIYAMA, H., OSA, T., ITO, Y., SUZUKI, H., MISHIMA, K.: Topical differences in excitation and contraction between guinea pig stomach muscles
In: Physiology of smooth muscle, ed. by E. Bülbring, M.F. Shuba, 185-196, Raven Press New York (1976)

- KURIYAMA, H., OSA, T., TASAKI, H.: Electrophysiological studies of antrum muscle fibers of the guinea-pig stomach
J.Gen.Physiol. 55, 48-62 (1970)
- KYNČL, J.: Circulatory effects of sodium nitroprusside.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 269, 390-391 (1971)
- LASSEN, U.V., STEN-KNUDSEN, O.: Direct measurements of membrane potential and membrane resistance of human red cells
J.Physiol. 195, 681-696 (1968)
- LING, G., GERARD, R.W.: The normal membrane potential of frog sartorius fibres
J.cell.comp.Physiol. 34, 383-396 (1949)
- v.LOH, D.: Temperatureinflüsse auf die Spontanaktivität isolierter Darm-Muskulatur, unter besonderer Berücksichtigung der Minutenrhythmik
Dissertation, Marburg (1969)
- MANDREK, K., GOLENHOFEN, K.: Activation of gastro-intestinal smooth muscle induced by the calcium ionophore A 23187
Pflügers Arch. 355, R60 (1975)
- MANDREK, K., GOLENHOFEN, K.: Activation of gastro-intestinal smooth muscle induced by the calcium ionophore A 23187
In: Pharmacologie et Physiologie des Muscles Lisses, Colloques de l'I.N.S.E.R.M., Paris (1976), in press
- McNEILL, J.H. et al.: The effect of vasodilator drugs on the nor-adrenaline constrictor response in the isolated mesenteric artery
Can.J.Physiol.Pharmacol. 47, 663-669 (1969)
- MAYER, C.J., van BREEMEN, C., CASTEELS, R.: The action of lanthanum and D600 on the calcium exchange in the smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli
Pflügers Arch. 337, 333-350 (1972)
- NASTUK, W.L., HODGKIN, A.L.: The electrical activity of single muscle fibres
J.cell.comp.Physiol. 35, 39-73 (1950)

- OKADA, Y., INOUE, A.: Tip potential and fixed charges on the glass wall of microelectrode
Experientia 31, 545-546 (1975)
- OSA, T.: An interaction between the electrical activities of longitudinal and circular smooth muscles of pregnant mouse uterus
Jap.J.Physiol. 24, 189-203 (1974)
- OSA, T., KATASE, T.: Physiological comparison of the longitudinal and circular muscles of the pregnant rat uterus
Jap.J.Physiol. 25, 153-164 (1975)
- PAGE, J.H., CORCORAN, A.C., DUSTAN, H.P., KOPPANYI, T.: Cardiovascular actions of sodium nitroprusside in animals and hypertensive patients
Circulation 11, 188-198 (1955)
- PAPASOVA, M.: An electrophysiological study of the motor activity of the stomach
Publishing House of the Bulgarian Academy of Sciences, Sofia (1970)
- PAPASOVA, M.P., NAGAI, T., PROSSER, C.L.: Two component slow waves in smooth muscle of cat stomach
Amer.J.Physiol. 214, 695 (1968)
- PROSSER, C.L.: Smooth muscle
Ann.Rev.Physiol. 36, 503-535 (1974a)
- PROSSER, C.L.: Diversity of electrical activity in gastrointestinal muscles
Proceedings of the Fourth international Symposium on gastrointestinal motility, Mitchell Press, Vancouver (1974b), pp. 21-37
- RIEMER, J., DÖRFLER, F., MAYER, C.-J., ULBRECHT, G.: Calcium-Antagonistic effects on the spontaneous activity of guinea-pig taenia coli
Pflügers Arch. 351, 241-258 (1974a)

- RIEMER, J., MAYER, C.-J., ULBRECHT, G.: Determination of membrane potential in smooth muscle cells using microelectrodes with reduced tip potential
Pflügers Arch. 349, 267-275 (1974b)
- SACHS, L.: Angewandte Statistik
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1974)
- SARNA, S.K., DANIEL, E.E.: Electrical stimulation of gastric electrical control activity
Amer.J.Physiol. 225, 125-131 (1973)
- SARNA, S.K., DANIEL, E.E., KINGMA, Y.J.: Stimulation of the electric-control activity of the stomach by an array of relaxation oscillators
Amer.J.dig.Dis. 17, 299-310 (1972)
- SOMLYO, A.V.:
In: The smooth muscle of the artery, ed. by S. Wolf, N.T. Werthessen, 35 pp., Plenum Press New York - London (1975)
- SOMLYO, A.V., SOMLYO, A.P.: Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle
J.Pharmacol.Exp.Ther. 159, 129-145 (1968)
- STÄMPFLI, R.: A new method of measuring membrane potentials with external electrodes
Experientia (Basel) 10, 508-509 (1954)
- STÄMPFLI, R.: Die doppelte Saccharosetrennwandmethode zur Messung von elektrischen Membraneigenschaften mit extrazellulären Elektroden
Helv.Physiol.Acta 21, 189-204 (1963)
- STEINSLAND, O.S., FURCHTGOTT, R.F., KIRPEKAR, S.M.: Biphasic vasoconstriction of the rabbit ear artery
Circul.Res. 32, 49-58 (1973)
- SZURSZEWSKI, J.H.: Recording electrical activity of smooth muscle by means of the sucrose gap
Proceedings of the Fourth International Symposium on Gastrointestinal Motility, Mitchell Press, Vancouver (1974), pp. 409-425

- TASAKI, J., POLLEY, E.H., ORREGO, F.: Action potentials from individual elements in cat geniculate and striate cortex
J.Neurophysiol. 17, 454-474 (1954)
- THIENES, C.H.: Altered responses of smooth muscle to autonomic drugs produced by physical and chemical changes
Arch.int.Pharmac. 31, 447-500 (1926), zitiert nach Kreye 1974
- TOMITA, T.: Electrical properties of mammalian smooth muscle
In: Smooth muscle, ed. by E. Bülbring, A.F. Brading, A.W. Jones, T. Tomita, 197-243, Edward Arnold (Publishers), London (1970)
- TOMITA, T., WATANABE, H.: Factors controlling myogenic activity in smooth muscle
Phil.Trans.R.Soc.Lond.B., 265, 73-85 (1973)
- WAGNER, B., GOLENHOFEN, K.: The Effect of sodium nitroprusside on spontaneous and acetylcholine-induced activity of guinea-pig stomach
Pflügers Arch. 355, Suppl., R59 (1975)
- WAGNER, B., GOLENHOFEN, K.: Measurement of membrane potential in smooth muscle cells of guinea-pig stomach using microelectrodes with different tip potentials
Pflügers Arch. 362, Suppl., R26 (1976)
- WANN, K.T., GOLDSMITH, M.W.: Reduction of tip potential artefacts in microelectrode measurements
Nat.physic.Sci. 238, 44-45 (1972)
- WESSELS, F., LOSSE, H.: Die Wirkung von Diazoxid bei arterieller Hypertonie
Herz/Kreislauf 1,3, 153-156 (1969)
- WILLIAMS, J.A., WITHROW, C.D., WOODBURY, D.M.: Effects of ouabain and diphenylhydantoin on transmembrane potentials, intracellular electrolytes, and cell pH of rat muscle and liver in vivo
J.Physiol. 212, 101-115 (1971)
- ZURMÜHL, R.: Praktische Mathematik für Ingenieure und Physiker
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963)

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Gießen:

Berz, Boerner, Clausnitzer, Endl, Ewald, Gaier, Grün, Hammerschick, Hanle, Henkel, Hoppe, Kockel, Kröhnke, Löb, Ludwig, Noli, Salzborn, Scharmann, Schmillen, Schneider, Schraub, Wollnik,

in Marburg:

Amon, Aziz, Braasch, Braun, Gallwitz, Golenhofen, Haberich, Hensel, Hildebrandt, Himmelmann, Ihm, Karlson, Koranski, v.Kraft, Nier, Portig, Priebe, Schachtschabel, Schneider, Schulte-Hermann, Wesemann, Wiegandt

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. K. Golenhofen für die Anregung zu dieser Arbeit und die großzügige Unterstützung bei deren Durchführung.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für die anregenden Diskussionen sowie für die Assistenz bei der Durchführung der Versuche und der Herstellung der Abbildungen.

Den Mitarbeitern der mechanischen Werkstatt danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Herstellung von Geräten.

Lebenslauf

Am 20.3.1943 wurde ich als zweiter Sohn des Buchdruckermeisters Joachim Wagner und dessen Ehefrau Elli in Berlinchen geboren. Nach Abschluß der Mittelschule 1959 in Mühlheim trat ich eine Maschinenschlosserlehre an, nach deren Beendigung ich ein Jahr als Facharbeiter tätig war. Ab 1963 studierte ich Maschinenbau an der Staatlichen Ingenieurschule Darmstadt und Kerntechnik an der Staatlichen Ingenieurschule Gießen. Danach begann ich ein Physikstudium an der Universität Gießen, das ich 1973 mit der Diplomprüfung abschloß. Von 1973 bis 1975 war ich als wissenschaftlicher Angestellter am Physiologischen Institut der Philipps-Universität Marburg tätig. Seit dem Sommersemester 1974 studiere ich Humanbiologie am Fachbereich Humanmedizin der Universität Marburg.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

"Untersuchungen zur Differenzierung von
P- und T-Aktivierungssystemen an der
Magenmuskulatur von Meerschweinchen"

am Physiologischen Institut unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. K. Golenhofen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, im Mai 1976

Bernad Wagner

